



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Académico Profesional de Química

**Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y
cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad
antioxidante, antimicrobiana de las hojas de
“*Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnston*” de la
zona de Yucay (Cusco)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico

AUTOR

Ana Cecilia COLINA RAMOS

ASESOR

Juana María HUAMÁN MALLA

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Colina, A. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Académico Profesional de Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

1251



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA ✓

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE QUÍMICA ✓

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria - Calle Germán Amézaga 375 - Lima 7

"Año de la consolidación del Mar de Grau"

96.

ACTA DE TITULACIÓN POR TESIS

Los suscritos miembros del Jurado, nombrados por la Dirección de la Escuela Académico Profesional de Química, bajo la Presidencia de la **Mg. GLORIA EVA TOMAS CHOTA** (Presidenta), la **Quím. MARÍA ANGÉLICA RODRÍGUEZ BEST** (Miembro) y la **Quím. JUANA MARÍA HUAMÁN MALLA** (Asesora), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada **ANÁLISIS FITOQUÍMICO, DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE FLAVONOIDES Y TANINOS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA DE LAS HOJAS DE "MUEHLENBECKIA HASTULATA (J.E.Sm) I.M. JOHNST" DE LA ZONA DE YUCAY (CUSCO)**, después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborada por la Bachiller en Química: **COLINA RAMOS, ANA CECILIA**, para optar el **TÍTULO PROFESIONAL de QUÍMICA**, acordaron calificarla con la **NOTA** de:

Dieciocho
(LETRA)

18
(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 01 de julio del 2016 ✓

Mg. GLORIA EVA TOMAS CHOTA
PRESIDENTA

Quím. MARÍA ANGÉLICA RODRÍGUEZ BEST
MIEMBRO

Quím. JUANA MARÍA HUAMÁN MALLA
ASESORA

Mg. SCILA REATEGUI SANCHEZ
DIRECTORA (e) DE LA E.A.P. DE QUÍMICA



INDICE

I. RESUMEN	10
II. INTRODUCCIÓN	11
III. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo General	13
3.2. Objetivos Específicos	13
IV. HIPÓTESIS.....	14
V. PRINCIPIOS TEÓRICOS	15
5.1. <i>Muehlenbeckia hastulata</i> (J.E.Sm) I. M. Johnst	15
5.1.1. Descripción Botánica.....	15
5.1.2. Distribución y Hábitat.....	16
5.1.3. Propiedades Medicinales	16
5.1.4. Clasificación Botánica	17
5.2. Metabolitos Primarios y Secundarios	18
5.2.1. Diferencias con los metabolitos primarios.....	19
5.2.2. Funciones que cumplen los metabolitos secundarios en las plantas.....	19
5.3. Flavonoides	20
5.3.1. Clasificación.....	21
5.3.2. Funciones y Propiedades	22
5.3.3. Aplicaciones Terapéuticas de los Flavonoides	23
5.3.4. Métodos de separación	24
5.3.5. Método de cuantificación de Flavonoides Totales	25
5.4. Taninos	27
5.4.1. Clasificación.....	27
5.4.1.1. Taninos Hidrolizables.....	27
5.4.1.2. Taninos Condensados	28
5.4.2. Funciones y propiedades de los taninos atribuidas en la planta	28
5.4.3. Usos Industriales	29
5.4.4. Cuantificación de taninos	29
5.4.4.1. Método de Lowenthal.....	29

5.5. Análisis Fitoquímico	30
5.6. Fenoles	30
5.6.1. Determinación de Fenoles Totales mediante el Método de Folin-Ciocalteu	30
5.7. Antioxidantes	31
5.7.1. Antioxidante	32
5.7.2. Clasificación de los antioxidantes	33
5.7.3. Radicales Libres	34
5.7.4. Estrés Oxidativo	34
5.7.5. Importancia de los antioxidantes para la salud	35
5.7.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante	36
5.8. Actividad Antimicrobiana	37
5.8.1. Metabolitos secundarios con propiedad antimicrobiana	37
5.8.1.1. Flavonas	37
5.8.1.2. Isoflavonoides	37
5.8.1.3. Taninos	37
5.8.1.4. Saponinas	37
5.8.2. Microorganismos utilizados	38
5.8.2.1. <i>Candida albicans</i>	38
5.8.2.2. <i>Salmonella enteritidis</i>	38
5.8.2.3. <i>Escherichia coli</i>	38
5.8.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	38
5.8.3. Determinación de la actividad antimicrobiana	39
5.9. Espectroscopia de Absorción Atómica	39
5.9.1. Fundamento	39
5.9.2. Minerales en las plantas	40
5.9.2.1. Clasificación de los nutrientes minerales	41
5.9.2.2. Manganeseo	41
5.9.2.3. Zinc	42
5.9.2.4. Hierro	42
5.9.2.5. Cobre	42
5.9.2.6. Metales pesados en las plantas	43

VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	45
6.1. Materiales, Equipos y Reactivos	45
6.2. Procedimiento	46
6.9.1. Recolección y Selección de la muestra	46
6.9.2. Tratamiento de la muestra	46
6.9.3. Obtención de los Extractos con Polaridad Creciente.....	46
6.9.4. Análisis Fitoquímico de los extractos	47
6.9.4.1. Saponinas	47
6.9.4.1.1. Prueba de espuma	47
6.9.4.1.2. Reactivo de Salkowski	47
6.9.4.1.3. Variante A de la reacción de Salkowski	47
6.9.4.1.4. Variante B de la reacción de Salkowski	48
6.9.4.1.5. Reactivo de Liebermann-Burchard	48
6.9.4.2. Flavonoides	48
6.9.4.2.1. Reactivo de Shinoda	48
6.9.4.2.2. Reacción con cloruro férrico	48
6.9.4.2.3. Reacción con NaOH 20%	48
6.9.4.3. Taninos.....	49
6.9.4.3.1. Reacción con gelatina-cloruro de sodio	49
6.9.4.3.2. Reacción con cloruro Férrico o alumbre férrico	49
6.9.4.3.3. Reacción de precipitación con agua de bromo.....	49
6.9.4.3.4. Reacción con formaldehído	49
6.9.4.3.5. Reacción con acetato de plomo.....	50
6.9.4.4. Antocianinas - Betalaínas	50
6.9.4.4.1. Adición de álcali: NaOH 20%	50
6.9.4.4.2. Reacidificación: HCl 1N.....	50
6.9.4.4.3. Adición de amoníaco	50
6.9.4.4.4. Adición de HCl 1N	50
6.9.4.4.5. Alcohol isoamílico-agua	51
6.9.4.5. Quinonas	51
6.9.4.5.1. Reacción con NaOH al 5%.....	51

6.9.4.5.2. Reacción de Borntränger	51
6.9.5. Método Espectrofotométrico para la Determinación Cuantitativa de Flavonoides Totales expresados como Quercetina	52
6.9.5.1. Curva de Calibración del Patrón Quercetina	52
6.9.5.2. Determinación Cuantitativa de Flavonoides Totales	52
6.9.6. Método de Lowenthal para Taninos	53
6.9.6.1. Solución Estandarizada de Permanganato de Potasio 0.1N.....	53
6.9.6.2. Contenido de Taninos Totales	53
6.9.6.3. Contenido de no Taninos	53
6.9.7. Fenoles Totales	54
6.9.7.1. Curva de Calibración de Contenido de Fenoles Totales	54
6.9.8. Capacidad Antioxidante.....	55
6.9.9. Determinación de la Actividad Antimicrobiana.....	56
6.9.9.1. Obtención de cepas	56
6.9.9.2. Medios de cultivo.....	56
6.9.9.3. Determinación de la Actividad Antimicrobiana	56
6.9.10. Determinación de Humedad.....	57
6.9.11. Determinación del contenido de ceniza	57
6.9.12. Determinación de Metales mediante Absorción Atómica	58
 VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	 59
7.1. Rendimiento de los Extractos con Solventes de Polaridad Creciente	59
7.2. Análisis Fitoquímico de los Extractos Secos con Polaridad Creciente	60
7.2.1. Saponinas.....	60
7.2.2. Flavonoides	61
7.2.3. Taninos	62
7.2.4. Antocianinas – Betalaínas	63
7.2.5. Quinonas	64
7.3. Método Espectrofotométrico para la Determinación Cuantitativa de Flavonoides Totales expresados como Quercetina	66
7.4. Método de Lowenthal para Taninos	66

7.5. Fenoles Totales	67
7.6. Capacidad Antioxidante	68
7.7. Determinación de la Actividad Antimicrobiana	71
7.8. Determinación del contenido de Humedad y Ceniza	75
7.9. Determinación de Metales mediante Absorción Atómica	75
7.10. TABLA COMPARATIVA	76
VIII. CONCLUSIONES	77
IX. RECOMENDACIONES	79
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
XI. ANEXO	88
11.1. Análisis Estadístico	88
11.1.1. Determinación de Flavonoides Totales	88
11.1.2. Determinación de Taninos por el Método de Lowenthal	88
11.1.3. Determinación de Fenoles totales	89
11.1.4. Determinación de la Actividad Antioxidante	90
11.1.5. Determinación de la actividad antimicrobiana	90
11.2. Análisis Fitoquímico	92
11.2.1. Saponinas	92
11.2.2. Flavonoides	93
11.2.3. Taninos	94
11.3. Determinación de Flavonoides Totales	95
11.4. Determinación de la Actividad Antioxidante	96

TABLAS

TABLA 1. Propiedades atribuidas a la <i>Muehlenbeckia hastulata</i> (J.E.Sm.) I.M. Johnst	17
TABLA 2. Diferencias entre los metabolitos primarios y secundarios	19
TABLA 3. Valores de absorción para las Banda I y Banda II de los diferentes tipos de flavonoides	26
TABLA 4. Alimentos antioxidantes y metabolitos secundarios que generan esta acción	32
TABLA 5. Clasificación de los antioxidantes, según su origen ³⁷	33
TABLA 6. Clasificación de los elementos esenciales según su concentración en la planta	41

TABLA 7. Concentración de los macro y micronutrientes expresados en miligramo por kilogramo o ppm en las plantas	44
TABLA 8. Rendimiento de los extractos con solventes de polaridad creciente	59
TABLA 9. Ensayos para la determinación cualitativa de saponinas	60
TABLA 10. Ensayos para la determinación cualitativa de flavonoides.....	61
TABLA 11. Ensayos para la determinación cualitativa de taninos	62
TABLA 12. Ensayos para la determinación cualitativa de antocianinas - betalaínas	63
TABLA 13. Ensayos para la determinación cualitativa de quinonas	64
TABLA 16. Determinación cuantitativa de flavonoides totales expresados como quercetina.....	66
TABLA 17. Determinación cuantitativa de taninos por el método de Lowenthal.....	67
TABLA 18. Determinación de fenoles totales en el las hojas de <i>Muehlenbeckia hastulata</i> (J.E.Sm) I.M. Johnst.....	68
TABLA 19. Valores de las absorbancias (nm), concentraciones (µg/mL) y porcentaje de inhibición (%I).....	69
TABLA 20. Concentración inhibitoria (IC ₅₀) de DPPH en el extracto metanólico.....	70
TABLA 21. Valores de los diámetros de los halos (Ø)	72
TABLA 22. Porcentaje de inhibición (%I) del extracto acuoso de las hojas de <i>Muehlenbeckia hastulata</i> (J.E.Sm) I.M. Johnst	72
TABLA 23. Valores del porcentaje de humedad y cenizas en las hojas de <i>Muehlenbeckia hastulata</i> (J.E.Sm) I.M. Johnst	75
TABLA 24. Concentración en partes por millón (ppm) de los metales presentes en las hojas de <i>Muehlenbeckia hastulata</i> (J.E.Sm) I.M. Johnst.....	76
TABLA 25. Fenoles totales y capacidad antioxidante en las hojas de <i>Muehlenbeckia hastulata</i> (J.E.Sm) I.M. Johnst	76
TABLA 26. Resultados estadísticos para la determinación de Flavonoides Totales.....	88
TABLA 27. Resultados estadísticos para la determinación de Taninos.....	89
TABLA 28. Resultados estadísticos para la determinación de fenoles totales	89
TABLA 29. Resultados estadísticos para la determinación la capacidad antioxidante	90
TABLA 30. Resultados estadísticos para la determinación la actividad antimicrobiana sobre <i>Salmonella enteritidis</i>	91
TABLA 31. Resultados estadísticos para la determinación la actividad antimicrobiana sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	91

DEDICATORIA.

Dedico mi tesis de manera muy especial a mis queridos padres y hermano, por brindarme su apoyo en todo este tiempo; a todas aquellas personas y amigos que hicieron posible realizar esta investigación y sobre todo a mis queridos tíos Angela Chafloque Aragón y Juan Carlos Gavancho, quienes me apoyaron en la recolección y me mostraron las bondades de la naturaleza a través de esta planta.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tíos Angela Chafloque Aragón y Juan Carlos Gavancho, ya que gracias a ellos he conocido e investigado esta planta.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A mi asesora de tesis, Mg. Juana María Huamán Malla por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, experiencia y motivación me guió en esta investigación.

Me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado a mi formación y en especial a mis profesores Quím. Marcos Guerrero y al Mg. Juan Carlos Woolcott Hurtado por sus consejos, sus enseñanzas y sobre todo por su amistad.

Así mismo me gustaría agradecer a la directora de la Unidad de Servicios de Análisis Químicos, María Angélica Rodríguez Best y al Dr. Julio Santiago por el apoyo en esta investigación y sobre todo por sus consejos y amistad.

Y por último mi compañero de laboratorio y colega Jesús Ochoa por brindarme su visión crítica y apoyo en esta investigación.

Siempre estaré agradecida con aquellas personas que formaron parte de mi vida profesional, amigos que me brindaron su apoyo, amistad, consejos y fortaleza cuando más lo necesitaba; sin importar donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo aquello que me han brindado.

Para ellos: Muchas Gracias.

I. RESUMEN

La especie *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, es una planta oriunda del Perú poco estudiada; esta investigación tiene la finalidad de contribuir al conocimiento fitoquímico y microbiológico de las hojas, debido a que es usada en la medicina tradicional de los pobladores de la provincia de Urubamba. Se desea determinar la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides y taninos, los cuales son compuestos fenólicos que tienen propiedades antioxidantes y bactericidas.

Esta especie fue recolectada en el distrito de Yucay, provincia de Urubamba en el departamento del Cusco.

Mediante la determinación de flavonoides totales, se cuantificaron los flavonoides (1,70 mg de quercetina/g muestra); también se realizó la cuantificación de taninos por el método de Lowenthal (1,03 mg ácido tánico/100 g de muestra).

Al corroborar la presencia de estos metabolitos secundarios, se llevó a cabo la determinación de fenoles totales (1,17 mg ácido gálico/100 g de muestra) y capacidad antioxidante (6,58 µg/mL) en las hojas, esto hace que se le atribuya propiedades diuréticas y contra la fragilidad capilar entre otras.

Con la finalidad de dar una mayor contribución al conocimiento se realizaron pruebas para determinar la actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados fueron positivos para los dos últimos microorganismos.

Por último se determinó el porcentaje de humedad (64.34 %) y cenizas (3.3 %) en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, además de la determinación de algunos micronutrientes (Hierro, Sodio, Zinc, Manganeseo y Cobre) y comprobando que metales pesados como: plomo y cromo, se encuentran en proporciones menores a 0,5 ppm.

II. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen una fuente de metabolitos secundarios, los que le otorgan sus propiedades terapéuticas características, las cuales son de gran importancia para el control de muchas enfermedades. Nuestro país, el Perú, cuenta con una diversidad de flora única en el mundo, la misma que está representada por más de 25,000 especies existentes aproximadamente, por otro lado 4000 especies tienen diversos usos en la alimentación, salud, cosmética, tintura, como aromatizante, saborizantes, insecticidas entre otros usos.¹

La *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst es una de las plantas con excelentes propiedades medicinales, sus hojas y tallos son empleados debido a sus efectos: antiinflamatorio, analgésica, anestésica además de sus propiedades cicatrizantes y antioxidantes ². El nombre común que le dan los pobladores es de Mullaca, dicha planta crece de forma silvestre en el departamento del Cusco, exactamente en el Valle Sagrado, se puede encontrar en la carretera hacia Urubamba y Maras.

A través de artículos se sabe que la *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst presenta algunos metabolitos secundarios como Taninos, Flavonoides, Saponinas triterpénicas y esteroidales además de su actividad antioxidante. Sus propiedades medicinales van de la mano con el tipo de metabolito que presente la planta. ³

Los flavonoides son metabolitos secundarios que denotan un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo-γ-pirano, los cuales están distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos; es frecuente encontrarlos en las semillas, raíces, frutos, hojas, tallos y flores.

Los Flavonoides presentan una gran importancia para los seres humanos, ya que son parte de nuestra dieta y se presentan a través de distintas fuentes; como ejemplo podemos mencionar el perejil donde encontramos flavonas y flavonoles en una concentración de 50 mg/100g, en los granos de cebada se encuentran polímeros de flavanos en una concentración aproximada de 20 mg/100 g, en los vinos blancos se tiene 50 a 75 mg/L de flavonoides. ⁴

Entre las diversas actividades que presentan los flavonoides, las que están adquiriendo más importancia son la citotóxica, quimiopreventiva, mutagénica y antimutagénica. Los flavonoides también están relacionados con la ecología cumpliendo diversos roles como en la polinización, estimulantes de la oviposición y también actuando como defensa contra los microorganismos e insectos. ^{5; 6}

Es indudable la importancia que los Taninos han adquirido a través de los años, se sabe que son metabolitos secundarios polifenólicos presentes en el reino vegetal. Pueden encontrarse en todas las partes de las plantas: tallos, madera, hojas, semillas y cúpulas.^{7; 8}

Los Taninos cumplen la función de protectores, evitando el ataque de insectos y hongos; es por ello que se les atribuye propiedades fungicidas y bacteriostáticas.

Esta investigación está dirigida a determinar tanto cualitativamente como cuantitativamente la presencia de Taninos y Flavonoides empleando métodos volumétricos y espectrofotométricos respectivamente, además de demostrar su actividad antimicrobiana y capacidad antioxidante, estas determinaciones tienen el objetivo de demostrar el poder curativo que presenta dicha planta frente a problemas musculares, actuando como un potente antiinflamatorio y analgésico. Mediante entrevistas directas con los pobladores del distrito de Yucay, se llegó a conocer el efecto y la importancia de la Mullaca como medicina natural, la cual es empleada por pobladores frente a enfermedades como el asma, gingivitis entre otras.

En el Perú la Mullaca es una planta con pocas referencias bibliográficas; sin embargo Brasil, Chile y Argentina presentan investigaciones, debido a las propiedades que se le atribuyen.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Realizar un análisis fitoquímico, extracción, purificación y desarrollo de métodos de valoración de los dos metabolitos secundarios más importantes presentes en la especie *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, además de verificar su actividad biológica y capacidad antioxidante.

3.2. Objetivos Específicos

- Clasificación botánica.
- Realizar el Análisis Fitoquímico a la *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.
- Reconocer los principales metabolitos secundarios.
- Determinación del contenido de humedad de las hojas.
- Determinación del contenido de ceniza en las hojas.
- Determinación del contenido de minerales empleando el equipo de Absorción Atómica.
- Extracción sucesiva de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst con solventes de polaridad creciente.
- Desarrollar los métodos de extracción, purificación para taninos y flavonoides presentes.
- Determinación cuantitativa del contenido de Taninos presentes en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.
- Determinación cuantitativa del contenido de flavonoides presentes en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.
- Realizar el análisis antimicrobiano.
- Realizar el análisis antioxidante.
- Determinación de fenoles totales.

IV. HIPÓTESIS

La presencia de Flavonoides y Taninos serán los responsables de las propiedades medicinales de la “*Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M.Johnst”. La cantidad de flavonoides y taninos será considerable debido al uso terapéutico que se le da en las poblaciones rurales. La cantidad de fenoles totales corresponderán a la capacidad antioxidante y antimicrobiana encontrada.

V. PRINCIPIOS TEÓRICOS

5.1. *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I. M. Johnst

Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I. M. Johnst es una especie botánica, que pertenece a la familia Polygonaceae, dicha familia es reconocida en el Perú por presentar diez géneros y 73 especies. Es conocida popularmente como mullaca, quilo, mollaca, voqui, voqui negro. Se sabe que la *Muehlenbeckia* tiene una distribución amfipacífica, con especies en Nueva Guinea, Australia, Nueva Zelanda y Sudamérica. En Sudamérica la podemos encontrar en el Perú, Chile y Argentina.^{9; 10}

5.1.1. Descripción Botánica

Es un arbusto liso, con tallos rojizos, flexuosos de 1 a 2 m de altura. Presenta hojas alternas, carnosas o coriáceas, pecioladas, lámina de forma variable, triangulas, oblonga, lanceolada, truncadas o atenuadas en la base; pecíolos de 0,2-0,5 cm, con un nervio central muy marcado de 1 a 4 cm de longitud. Inflorescencias: pleiotirsos ramificados axilares o terminales de 3-5 cm, dispuestas en glomérulos o racimos, cortadamente pecioladas de 1-2 mm de color blanco, perigonio de 2-3 mm, aquenios triquetros de 3-4 por 2-3,5 cm con superficie lisa o rugosa. Las masculinas de 2 a 3 mm de diámetro, verdosas, a veces coloreadas de púrpura; las femeninas de 3 a 4 mm de diámetro, verdosos o púrpura; la floración se produce desde Agosto a Enero. El fruto 5 mm de longitud en aquenio, son comestibles. (FIGURA 1).



FIGURA 1. *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm.) I.M. Johnst colectada, *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm.) I.M. Johnst con flor.

5.1.2. Distribución y Hábitat

Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst se puede encontrar en el distrito de Yucay, provincia de Urubamba en el departamento del Cusco, además de otros departamentos como Arequipa, La Libertad y Pasco a diferentes altura entre ellas a 2500-3000, 3000-3500, 3500-4000 msnm. Generalmente están situadas en valles secos, riberas y laderas rocosas, además crece en climas templados y fríos (FIGURA 2).¹¹



FIGURA 2. *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm.) I.M. Johnst Yucay-Urubamba, Cusco.

5.1.3. Propiedades Medicinales

Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst no se cultiva ni se ha domesticado, sólo es recolectada para uso curativo. Las raíces y hojas en infusión se emplean como diurético, antihemorrágico, sedante, afecciones hepáticas (ictericia), para el tratamiento del reumatismo, además se le atribuye propiedades purgativas y como hipotensor. Con respecto a usos externos es útil para curar heridas y úlceras, debido a su propiedad astringente. Las raíces presentan un efecto abortivo en los humanos y animales debido a su motilidad uterina (TABLA 1).¹²

TABLA 1. Propiedades atribuidas a la *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm.) I.M. Johnst⁶⁷

Propiedad	Especificaciones
Fragilidad capilar	Esta especie presenta una concentración alta de rutina.
Laxante	La infusión de la raíz tiene acción laxante.
Teñido de lana	Tiñe de anaranjado la lana mordentada con sulfato de aluminio.

5.1.4. Clasificación Botánica

De acuerdo a la Clasificación de James Edward Smith e Ivan Murray Johnston y examinada por el Departamento Académico de Botánica, de la Facultad de Ciencias Biológicas:

Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Polygonaceae
Género	Muehlenbeckia
Especie	<i>hastulata</i> (J.E.Sm) I.M. Johnst.



FIGURA 2. *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm.) I.M. Johnst

5.2. Metabolitos Primarios y Secundarios

Cualquier organismo viviente contiene en su estructura productos químicos, en su mayoría orgánicos. Estos compuestos químicos son el resultado de la actividad metabólica, por ello es frecuente denominarlos metabolitos.¹³

Los compuestos orgánicos que se encuentran en los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos principales: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son los más abundantes y se denominan así por formar parte de la base fundamental de los procesos vitales, ya que intervienen en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas; siendo parte de ellos, las proteínas, los ácidos nucleídos y los tipos más frecuentes de carbohidratos y lípidos. Por el contrario los metabolitos secundarios se dan de manera restringida, generalmente en pequeñas cantidades, a diferencia de los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia siendo no esenciales para la vida como tal, aunque ello no excluye la posibilidad de que puedan ser de utilidad para el organismo particular que lo produce.¹³

5.2.1. Diferencias con los metabolitos primarios

Mediante la siguiente tabla presento las diferencias que existe entre los metabolitos primarios y secundarios (TABLA 2).

TABLA 2. Diferencias entre los metabolitos primarios y secundarios

METABOLITOS PRIMARIOS	METABOLITOS SECUNDARIOS
Productos del metabolismo general	Productos del metabolismo especial
Ampliamente distribuido en plantas y animales	Biosintetizados a partir del metabolismo primario
Distribución taxonómica restringida	Distribución taxonómica restringida
Indispensables para la vida	No indispensables para la vida
Aminoácidos de proteínas, monosacáridos, lípidos, glucósidos, entre otros.	Saponinas, Alcaloides, Taninos, Flavonoides, entre otros.

5.2.2. Funciones que cumplen los metabolitos secundarios en las plantas

Las plantas al igual que los animales, las algas, los hongos y las bacterias, realizan funciones fisiológicas en las que están implicadas rutas metabólicas. Estas funciones son fundamentales para que estos organismos se mantengan con vida; las plantas son poseedoras casi exclusivas de otras rutas metabólicas por las que sintetizan una variedad de sustancias llamadas metabolitos secundarios.¹⁴

Todas las sustancias que el hombre ha obtenido a partir de las plantas y a empleado para diferentes fines son productos del metabolismo secundario, por ejemplo a través de los taninos los hombres curtieron pieles de animales que luego utilizaron para cubrirse, los flavonoides otorgan propiedades antioxidantes combatiendo el estrés oxidativo y son los aceites esenciales metabolitos secundarios que dan el aroma a las flores.¹⁴

Estos metabolitos cumplen funciones importantes en las plantas, como es el mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos e insectos para una contención rápida frente a algún daño ya sea local o en sitios lejanos al daño, esto es conocido como la respuesta sistemática. Otra de las funciones es la interacción entre las plantas cuando se presentan fenómenos de alelopatía, finalmente son responsables de los diversos colores de las flores, así como también facilitar la polinización.¹⁵

5.3. Flavonoides

Los flavonoides forman parte de una clase muy abundante de productos naturales presentes en las plantas superiores, así también en helechos, pero no en hongos, mohos ni bacterias. Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general $C_6-C_3-C_6$, los cuales pueden o no formar un tercer anillo.¹⁶

Los anillos son denominados A, B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual emplea números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (FIGURA 3).¹

Los flavonoides suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan como agliconas libres.¹

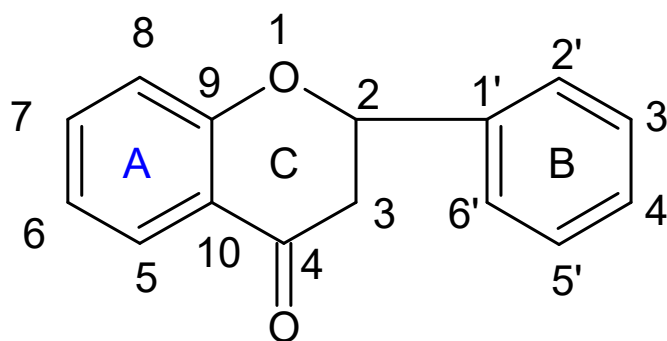
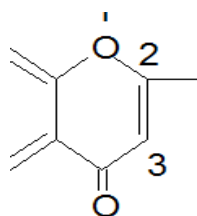


FIGURA 3. Estructura básica del esqueleto flavonólico

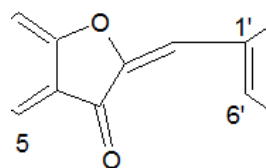
5.3.1. Clasificación

Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo C. En esta clasificación es importante el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo B (FIGURA 4).

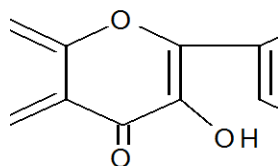
Los tipos de flavonoides están relacionados por una ruta biosintética común, la que incorpora precursores de las rutas del shiquimato y la de acetato-malonato. Posteriores modificaciones ocurren en varios estados, lo que resulta en la extensión de la hidroxilación, metilación, isoprenilación, dimerización y glicosilación, produciendo O y C-glicósidos. La glicosilación de los flavonoides produce que sean menos reactivos y más solubles en agua. El azúcar que generalmente está presente en los flavonoides es la glucosa, aunque también se puede encontrar galactosa, ramnosa y xilosa. En el caso de los flavonoides C-glicósidos, los azúcares pueden unirse al núcleo bencénico del flavonoide por enlaces carbono-carbono, con la diferencia de que el ataque se realiza sólo a las posiciones 6 y 8 del núcleo del flavonoide.¹



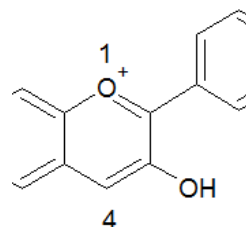
FLAVONAS



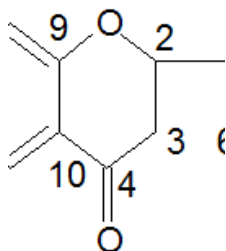
AURONAS



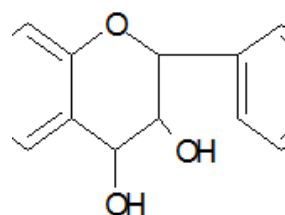
FLAVONOL



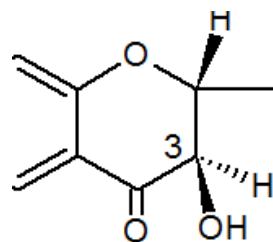
ANTOCIANIDINA



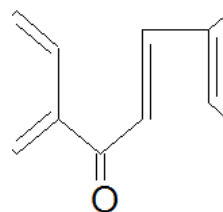
FLAVANONA



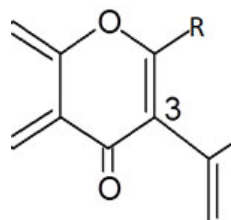
LEUCOANTOCIANIDINA



FLAVANANOL



CHALCONA



ISOFLAVONA

FIGURA 4. Estructura central del esqueleto flavonólico de los principales subgrupos de flavonoides.

5.3.2. Funciones y Propiedades

Las propiedades físicas dependen de la clase y la forma del flavonoide (libre, glicósido o sulfatado). Las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanoles debido al carbono quiral C-2 presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos.¹⁷

La solubilidad depende de la forma en que se encuentra y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. La agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en etanol, metanol y n-butanol, mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas altamente metoxilados son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.¹⁷

Las funciones de los flavonoides en las plantas se pueden resumir en tres grupos: papel de defensa frente a agentes agresores externos como es la radiación UV, bacterias, hongos, insectos y frente a otras plantas; como señal química o marcadores florales que sirven para guiar a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, facilitando la polinización además de estimuladores de la oviposición; finalmente presentan su efecto sobre las enzimas. Recientemente se ha demostrado el efecto de algunos flavonoides en la inhibición de infecciones de origen viral en las plantas, entre los que se encuentran la acción contra el virus del mosaico del tabaco y el virus X (PVX) de la papa.^{1; 18; 19}

Estos metabolitos secundarios son capaces de suprimir la formación de radicales libres por enlaces con iones de metales pesados, los cuales catalizan muchos procesos conllevando a la aparición de radicales libres.²⁰

5.3.3. Aplicaciones Terapéuticas de los Flavonoides

El uso de los flavonoides en el tratamiento de las enfermedades ha estado basado en el empirismo, ya que la práctica es mucho más antigua que la ciencia química de estos compuestos. Los efectos farmacológicos han llegado a ser conocidos con el descubrimiento de nuevos flavonoides de origen vegetal, y a través de la variación de la estructura química de las flavonas y derivados.^{16; 21}

Algunas de las propiedades terapéuticas que presentan son las siguientes:

- Actividad contra la fragilidad capilar (Citrus, rutina y derivados).
- Acción antiinflamatoria (taxifolina y bavaquinina).
- Acción antialérgica (baicaleína y sales derivadas de las cromonas).
- Antihepatotóxico (silimarina).
- Antiesclerótica y antiedematosa (rutina).
- Contra la arterioesclerosis.
- Contra la diabetes mellitus (quercetina).
- Expectorante.
- Contra la úlcera al estómago y el duodeno.
- Antiviral.
- Antimicrobiano.
- Acción diurética.

5.3.4. Métodos de separación

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material vegetal fresco o también se puede realizar con el material vegetal seco (30° C ó 40° C). Luego debe molerse finamente de esta forma facilitar la extracción de los compuestos flavonoides; estos se pueden extraer indistintamente debido a la solubilidad que presenten en diferentes solventes orgánicos.

Generalmente se puede realizar métodos de identificación cualitativos como:

- Ensayo de Shinoda, donde flavonoides con el núcleo benzopirona producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado.
- Ensayo con Zn/HCl, se producen coloraciones rojo-violeta debido a la presencia de dihidroflavonoles.
- Ensayo de Pacheco, los dihidroflavonoles producen un color rojo característico, las flavonas, chalconas, auronas, flavonoles y flavononas dan negativo.
- Ensayo del estroncio-amoniaco, empleado para distinguir entre flavonas y flavonoles-3-O-sustituídos.

La etapa del aislamiento y purificación es importante en la separación e identificación de los flavonoides presentes en el extracto. Se puede emplear diferentes técnicas, una de ellas son las cromatográficas como es la cromatografía de papel, la cromatografía de capa fina, la cromatografía de columna y especialmente la cromatografía líquida de alta resolución.¹

Aunque el método más usual para un análisis preliminar es la absorción UV-Vis; esta técnica es usada tanto para identificar el tipo de flavonoide como el modelo de oxigenación. Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos 240- 285 nm (Banda II) y 300-550 nm (Banda I), (FIGURA 5).¹⁷

Muy poca es la aplicación de la técnica IR en el análisis de flavonoides debido a que los espectros UV son mas informativos y requieren menos material vegetal, sin embargo algunas absorciones características pueden ser útiles como la absorción C=O entre 1680 y 1640, aromáticos entre 1600 y 1500 y –OH quelatado a 3500-3200.²²

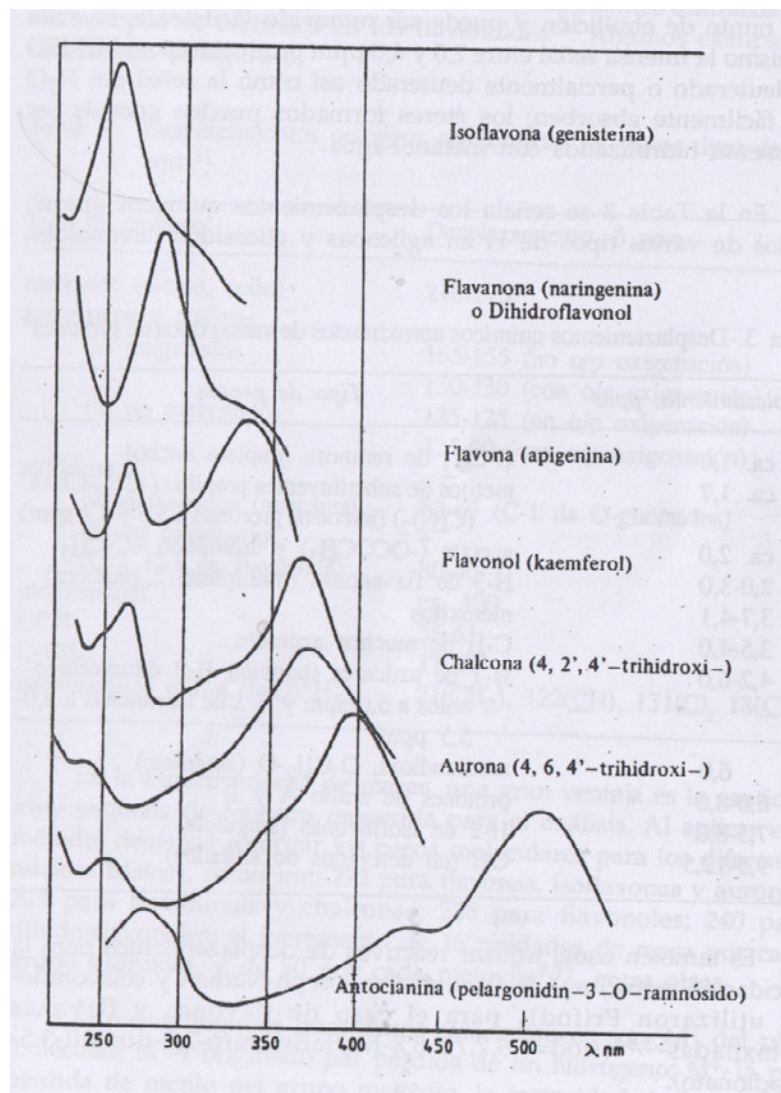


FIGURA 4. Espectros de absorción UV-Vis de diferentes tipos de flavonoides con modelos de hidroxilación equivalente.

5.3.5. Método de cuantificación de Flavonoides Totales

Los flavonoides son compuestos fenólicos ampliamente encontrados en frutas, vegetales y extractos de plantas. Son importantes debido a los efectos farmacológicos como vasodilatadores, antiinflamatorio, antiviral y sobre todo por sus propiedades antioxidantes.^{22; 23}

Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos formando glicósidos, son polares y se solubilizan en disolventes polares como el metanol, etanol o agua; los más representativos son el kaemferol, la quercetina y la miricetina.²⁴

Mediante cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficiencia y espectrofotometría, se cuantifican los flavonoides. Los métodos por cromatografía de gases y de alta eficiencia aportan información definitiva en la caracterización de las muestra pero presentan limitaciones importantes debido a los costos del equipamiento, sin embargo los métodos espectrofotométricos permiten cuantificar flavonoides con estructuras similares; es por eso que la cuantificación de flavonoides totales será expresado como quercetina.^{24; 25; 26}

La quercetina, presenta dos bandas de absorbanza características de las flavonoles; la primera banda (Banda I) presenta un máximo de 368 nm debido a las transiciones electrónicas que ocurre en el anillo B y en la segunda banda (Banda II) presenta un máximo de absorbanza de 255 nm que corresponde al anillo A (TABLA 3).²³

TABLA 3. Valores de absorción para las Banda I y Banda II de los diferentes tipos de flavonoides²²

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonoide
250-280	310-350	Flavonas
250-280	330-360	Flavonoles (3-OH substituido)
250-280	350-385	Flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330	Isoflavonas
275-295	300-330	Isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270	340-390	Chalconas
230-270	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas, antocianinas

5.4. Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios polifenólicos de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada y con sabor astringente. Pueden encontrarse en todas las partes de la planta, por ejemplo en tallos, madera, hojas, semilla y cúpulas. Dentro de los vegetales los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas u otros.^{27; 28}

5.4.1. Clasificación

La clasificación de Freudenberg, tiene su fundamento en el tipo de estructura base del tanino. Agrupando en dos clases: taninos hidrolizables y condensados.²⁷

5.4.1.1. Taninos Hidrolizables

Se hidrolizan por la acción de los ácidos, bases o enzimas en un azúcar un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del ácido utilizado se produce una subclasificación, los galotaninos (ácido gálico) y elagitaninos (ácido elágico). Se conoce que no precipitan con soluciones de bromo y que al reaccionar con FeCl_3 dan una coloración azul (FIGURA 5).²⁷

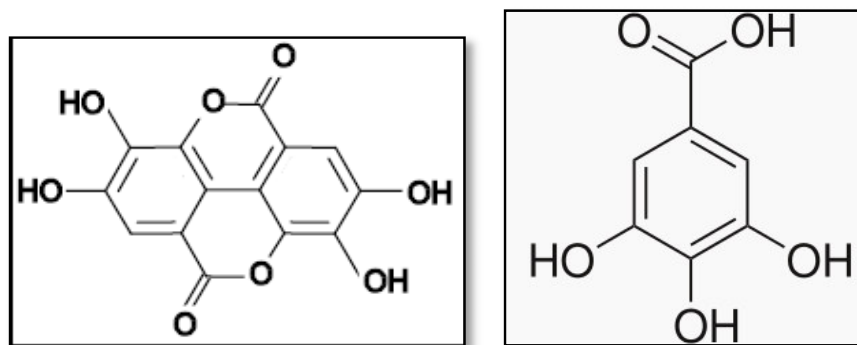


FIGURA 5. Estructuras del ácido gálico y elágico respectivamente ²⁷

5.4.1.2. Taninos Condensados

Los Taninos condensados, son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles, conocidos como proantocianidinas condensadas, al ser tratados con ácidos en caliente se origina una polimerización progresiva hasta dar taninos amorfos o taninos rojos. Al reaccionar con FeCl_3 se produce una coloración verde y precipita con soluciones de bromo.²⁷

5.4.2. Funciones y propiedades de los taninos atribuidas en la planta

Algunas de las funciones que desempeñan los taninos en las plantas²⁷:

- Contribuye a la formación del súber.
- Juegan un papel protector, evitando el ataque de insectos y hongos, de allí que se les atribuye propiedades fungicidas y bacteriostáticas.
- Cumplen el papel de moderador de los procesos de oxidación y de acciones anti fermentos.
- Considerados sustancias de reserva y materiales de desecho luego de proteger a la planta en ciertas etapas del crecimiento, finalmente se destruyen o depositan como producto del metabolismo en ciertos tejidos muertos de la planta madura, como el súber externo, el leño y las agallas.
- Capacidad de combinarse con diversas sustancias formando complejos.

De las actividades farmacológicas de los taninos se destaca sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. Por vía interna se emplean como antidiarreicos, favoreciéndose esta actividad debido al efecto antiséptico, ya que precipitan las enzimas extracelulares secretados por los microorganismos causantes de las infecciones. Además se les atribuye propiedades vasoconstrictoras, por lo que se emplean en el tratamiento de afecciones vasculares como varices o hemorroides y en pequeñas heridas. Respecto al uso tópico están siendo empleados en diversos problemas de la piel como dermatosis además en cosmética como tónicos astringentes. Es conocido las propiedades antioxidantes, comportándose como captadores de radicales libres.²⁸

5.4.3. Usos Industriales

El empleo más antiguo de los taninos es en la industria de la curtiembre, aunque en la actualidad se utilizan otros compuestos para curtir; los taninos y las macromoléculas se combinan debido a los grupos fenólicos formando puentes de hidrógeno a la vez se establecen enlaces covalentes que son los que aseguran que la unión perdure a lo largo del tiempo. Para ello se requiere que el tanino posea una masa molecular no demasiado elevada para que pueda intercalarse entre los espacios interfibrilares y no muy pequeña, ya que no formaría suficiente número de enlaces como para asegurar la estabilidad de la unión en el tiempo.²⁸

Los taninos hidrolizables se emplean en las industrias de alimentos, se puede remover impurezas proteínicas por precipitación con taninos.²⁷

5.4.4. Cuantificación de taninos

Debido a la clasificación de los taninos, en condensados e hidrolizables, existen diversos métodos de cuantificación, por ejemplo el método de Lowenthal, el método de Folin-Ciocalteu, método de Stiasny, el método de la Proantocianidina, entre otros. Estos métodos están basados en tres propiedades de los taninos:²⁹

- La habilidad de precipitar proteínas y alcaloides.
- Reactividad de sus anillos fenólicos.
- Productos de su despolimerización.

5.4.4.1. Método de Lowenthal

El método de Lowenthal es volumétrico y está basado en la oxidación del tanino por acción de permanganato de potasio (KMnO_4) en presencia del añil sulfonado (índigo de carmín), sirviendo este como indicador y como regulador de la reacción. Debido a la naturaleza del ácido gálico y otros compuestos que estén presentes, se oxidan del mismo modo que el tanino, por ello es necesario realizar una segunda valoración después de separar el tanino, calculando éste por diferencia. Para realizar esta operación puede emplearse caolín o una solución recién preparada de gelatina.^{27; 30; 31}

5.5. Análisis Fitoquímico

Existen diferentes métodos cualitativos para la detección preliminar de los diferentes metabolitos secundarios que pueden encontrarse en las plantas, basados en la extracción de estos mediante solventes orgánicos de diferentes polaridades y aplicando pruebas de coloración.^{22; 32}

Respecto a las pruebas cualitativas, estas son realizadas para identificar la presencia de el o los tipos de metabolitos secundarios que presentan las plantas, cabe mencionar la prueba de espuma en el caso de saponinas, la reacción de los flavonoides con el reactivo de Shinoda, la reacción de los taninos con gelatina- cloruro de sodio, entre otros.

5.6. Fenoles

Las plantas producen una variedad de metabolitos secundarios que contienen un grupo fenol, los cuales presentan un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático y son solubles en solventes orgánicos, de acuerdo con su diversidad química los fenoles cumplen funciones en la defensa de las plantas contra herbívoros o patógenos, otros son parte del soporte mecánico, en la atracción de polinizadores y en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras cercanas.³³

5.6.1. Determinación de Fenoles Totales mediante el Método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin- Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, el cual reacciona con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico- fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico- fosfotúngstico en óxidos. Cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional la cantidad de grupos hidroxilos presentes a la intensidad del color azul, este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia de UV-Vis debido a que puede absorber a una longitud de 760 nm, además el contenido de fenoles totales generalmente se expresa en equivalente de ácido gálico (FIGURA 7).³⁴

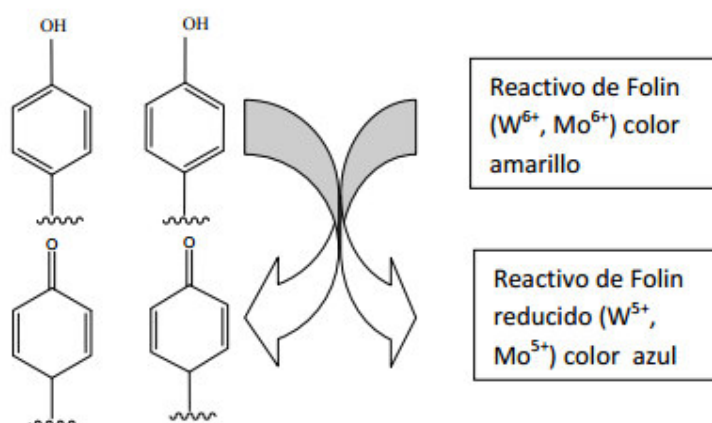


FIGURA 7. Mecanismo de acción del reactivo de Folin- Ciocalteu

5.7. Antioxidantes

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa frente a los estímulos del ambiente; algunas respuestas de defensa se manifiestan sólo bajo alguna condición inductiva y se observan durante la adaptación de las plantas al ambiente frente a factores bióticos como patógenos, plagas y simbiontes, o por factores abióticos como alta o baja temperatura, radiación, salinidad, entre otros. Las respuestas inducidas también pueden ser de largo plazo y estas son las responsables de la conocida plasticidad fenotípica de las plantas, produciendo alteraciones en los programas de desarrollo.³⁵

Las respuestas que ocurren frente a cualquier factor ambiental dependen de la acción de señalizadores que interaccionan con receptores específicos, los cuales inducen la síntesis y acumulación de ciertos metabolitos secundarios, fitoalexinas, proteínas u otros compuestos, por ello entre los sistemas de respuesta se encuentra la síntesis de fitoquímicos y antioxidantes, siendo estos compuestos que cumplen funciones importantes:³⁵

- Atrapadores de radicales libres.
- Estabilizadores.
- Protectores del DNA y proteínas frente al estrés por oxidación.

5.7.1. Antioxidante

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor). Los niveles bajos o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células.³⁶

En los seres humanos los antioxidantes se obtienen mediante la ingesta de alimentos frescos y crudos (frutas y vegetales), cabe mencionar que los alimentos procesados contienen menos concentración de antioxidantes ya que en el proceso de preparación se expone al alimento ante el oxígeno; algunas fuentes ricas de antioxidantes (TABLA 4).³⁶

TABLA 4. Alimentos antioxidantes y metabolitos secundarios que generan esta acción

ALIMENTO	ANTIOXIDANTE- METABOLITO SECUNDARIO
Uva	Flavonoides Hidrosolubles
Cereza	
Kiwi	
Ciruela	
Zanahoria	Alfa y beta carotenos
Tomate	
Naranja	
Papaya	
Lechuga	Catequinas y Polifenoles
Té verde	
Cacao	Isoflavonas
Lentejas	
Garbanzos	Taninos
Vino tinto	
Uvas	Quercetina
Cebolla roja	
Manzana	

5.7.2. Clasificación de los antioxidantes

- Los antioxidantes exógenos actúan como donadores de electrones, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.
- Los antioxidantes endógenos son normalmente bio-sintetizados por el organismo (TABLA 5).^{37; 38;39}

TABLA 5. Clasificación de los antioxidantes, según su origen³⁷

ORIGEN	COMPUESTOS	ACCIÓN
Exógenos	Vitamina E Vitamina C Betacarotenos Flavonoides Licopenos	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza el oxígeno singlete. • Neutraliza peróxidos • Neutraliza el oxígeno singlete. • Captura radicales libres de hidroxilo
Endógenos	Enzimáticos Superoxidos dismutasa Catalasa Glutación peroxidasa	Cofactor Cobre, sodio, manganeso Hierro Selenio
No enzimáticos	Glutación Coenzima Q Ácido Tioctico	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células transportadoras de metales.

5.7.3. Radicales Libres

Los radicales libres desde el punto de vista químico son cualquier especie que contenga un electrón desapareado en su órbita más externa y que sea capaz de existir en forma libre. Estos actúan como potentes agentes oxidantes y son la causa del envejecimiento al combinarse con moléculas como el DNA y proteínas.³⁶

Los radicales libres se forman debido a una ruptura homolítica y por reacciones de transferencia de electrones que sufren las moléculas estables. Se producen continuamente en el organismo debido a las reacciones bioquímicas de oxido-reducción con el oxígeno.³⁶

Factores que favorecen su formación:

- Radiación ionizante (ultravioleta, térmica).
- Contaminación ambiental.
- Disminución de la capacidad antioxidantes enzimática.
- Humo de cigarrillo.

Los radicales libres del oxígeno presentan una función fisiológica en el organismo, ya que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, pero que participan en reacciones que conducen a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS).^{37; 40; 41}

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:³⁷

- Radical hidroxilo (HO^\bullet)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O_2^-)
- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- Ozono (O_3)

5.7.4. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) ocurre cuando existe un desequilibrio en nuestras células debido a un aumento en los radicales libres y una disminución de antioxidantes del sistema endógeno.⁴²

La alteración de este equilibrio puede tener diversos grados de magnitud; en el estrés oxidativo leve, las defensas antioxidantes restablecen dicho equilibrio, pero en el estrés oxidativo grave se llega a graves alteraciones en el metabolismo celular. El daño por estrés oxidativo puede ser reversible como irreversible, eso dependerá de la edad del organismo, el estado nutricional, la efectividad de la defensa antioxidante y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes.^{43; 44}

5.7.5. Importancia de los antioxidantes para la salud

La presencia de antioxidantes naturales en nuestra dieta es importante, porque al ser ingeridos ayudan a preservar la salud de las personas que los consumen. La ingesta de 400 a 600 gramos por día de frutas y vegetales se asocia con la reducción de la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles. Sin embargo no todos los antioxidantes presentes en un alimento serán absorbidos en igual magnitud al llegar al tracto gastrointestinal, eso dependerá de otros factores:^{35; 45}

1. La estructura química de cada antioxidante en cuestión (eficiencia de absorción de los tocoferoles respecto a los carotenoides o a los flavonoides).
2. De la matriz en la cual cada antioxidante se encuentre formando parte del alimentos, es decir un fruto entero respecto a un jugo, liofilizado o micro encapsulado.
3. Del estado en que se encuentra el alimento a ser ingerido, es decir si se encuentra crudo o cocido, natural respecto al procesado.

El consumo de alimentos ricos en polifenoles, ya sean frutas, verduras, legumbres y cereales son favorables para la conservación y normalización de parámetros fisiológicos. Los flavonoides siendo los polifenoles más abundantes en los alimentos una de las funciones principales es la de antioxidantes, actuando como dadores de electrones a los radicales libres, poniendo fin a la cadena de oxidación.⁴⁵

La deficiencia de antioxidantes conlleva a un estrés oxidativo y como consecuencia de ello, la presencia de enfermedades crónicas degenerativas, en donde hay una asociación directa o indirecta con la exposición a los radicales libres. Algunas de estas enfermedades son: el Alzheimer, Parkinson, lesión cerebral hipertensiva, distrofia muscular, esclerosis múltiple, cáncer, degeneración de la retina, diabetes, infarto, envejecimiento, entre otras.⁴²

5.7.6. Determinación de la Capacidad Antioxidante

Existe una variedad de métodos para determinar la capacidad antioxidante de una sustancia. El método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil ó DPPH (Brand-Williams *et al.*; 1995), es el más usado y está basado en la estabilidad de dicho radical la cual se le atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción alrededor de 517nm.^{46; 47}

Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical ($R\cdot$) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia.⁴⁶

Finalmente se calcula el valor de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) o la concentración de compuestos antioxidantes que es capaz de inhibir el 50% del radical DPPH (FIGURA 8).

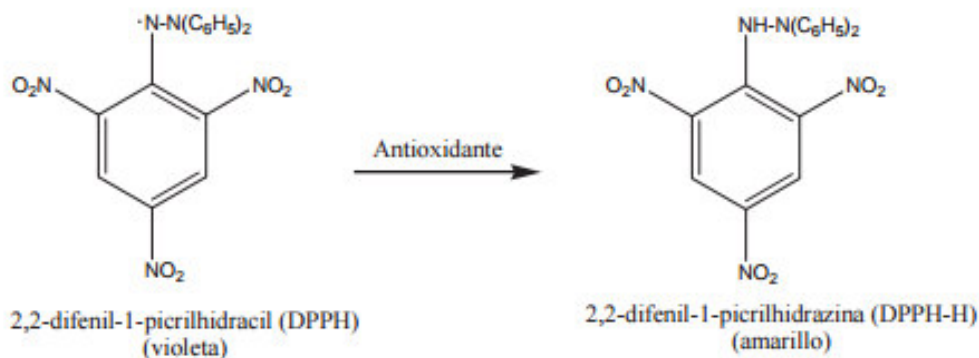


FIGURA 8. Reacción del radical ,1-difenil-2-picrilhidrazil con un antioxidante⁴⁸

5.8. Actividad Antimicrobiana

Las plantas superiores presentan metabolitos secundarios con buena actividad antimicrobiana; los cuales actúan, en bajas concentraciones, como mecanismos de defensa contra microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento.⁴⁹

5.8.1. Metabolitos secundarios con propiedad antimicrobiana

5.8.1.1. Flavonas

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana.⁵⁰

5.8.1.2. Isoflavonoides

Actúan como fitoalexinas, las cuales pueden ser definidas como compuestos antimicrobianos de pequeño peso moléculas o metabolitos de estrés biológico. Pueden ser constitutivos o también ser inducidos por ataque biológico o heridas. Los constituyentes varían entre las especies y el hábitat y distribución de la planta. Este tipo de flavonoides inhiben la germinación de esporas de hongos y causan daño a los sistemas de membrana.⁵⁰

5.8.1.3. Taninos

Sustancias de origen polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias.⁵⁰

5.8.1.4. Saponinas

Son los componentes principales de varios extractos de plantas, tienen actividad antiprotista. Las saponinas se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoos causando su inestabilidad, lisis y muerte celular.⁵⁰

5.8.2. Microorganismos utilizados

5.8.2.1. Candida albicans

Es la especie patógena más frecuente en el hombre, estos hongos viven como saprofitos sobre la piel y las mucosas del tracto respiratorio y digestivo. Es una levadura, redonda u ovoide con 3 mcm de diámetro, con o sin gemación. Se relaciona con los alimentos ya que es una levadura presente en la fermentación de éstos, atacando alimentos ricos en grasa, a pesar de ello otras especie de Candida tienen importancia industrial produciendo ácidos orgánicos.⁵⁰

5.8.2.2. Salmonella enteritidis

Es una bacteria formada por bacilos Gram negativos, anaerobio facultativo, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula. El género Salmonella es el agente causal de diferentes infecciones intestinales.⁵¹

5.8.2.3. Escherichia coli

Es un bacilo de 1-3 μm por 0.5 μm , que se presenta sólo en pares, en cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil, aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forma esporas y por lo general es no capsulado y Gram negativo. En agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm convexas y de coloración blanca un poco amarillenta.

Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo; su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C el pH favorable es de 7.⁵⁰

5.8.2.4. Staphylococcus aureus

Son cocos Gram positivos de 0,5 – 1 mcm de diámetro, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por si agrupación en forma de racimo.

Crece a una temperatura óptima de 37 °C y se desarrolla en un pH ligeramente alcalino de 7,6 la adición de glucosa favorece el crecimiento. *Staphylococcus aureus* se ha identificado como una de las principales causas de infección de heridas quirúrgicas.

5.8.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de difusión por discos (Bauer et al.), consiste en determinar la presencia de un halo de inhibición formado en el cultivo bacteriano demostrando así la actividad antimicrobiana del extracto acuoso. Consiste en añadir el extracto acuoso en diferentes placas Petri, los cuales contienen el medio agarizado sólido previamente inoculado con los microorganismos.⁵²

5.9. Espectroscopia de Absorción Atómica

5.9.1. Fundamento

La Absorción Atómica es una técnica capaz de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de elementos químicos. Este método consiste en la medición de especies atómicas por su absorción a una longitud de onda en particular. La especie atómica se logra por atomización de la muestra para llegar al estado fundamental del átomo, por lo que existen diferentes técnicas.^{53; 54}

La técnica más usada es la atomización con flama, la muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un rocío o pequeñas gotas de líquido. Las gotas formadas son conducidas a una flama, donde se originan la formación de átomos, los cuales absorben la radiación emitida por la lámpara y la cantidad de radiación absorbida está en función de su concentración, la señal de la lámpara una vez que pasa por la flama llega al monocromador, esta señal de radiación electromagnética llega a un detector y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura (FIGURA 9).^{53; 54}

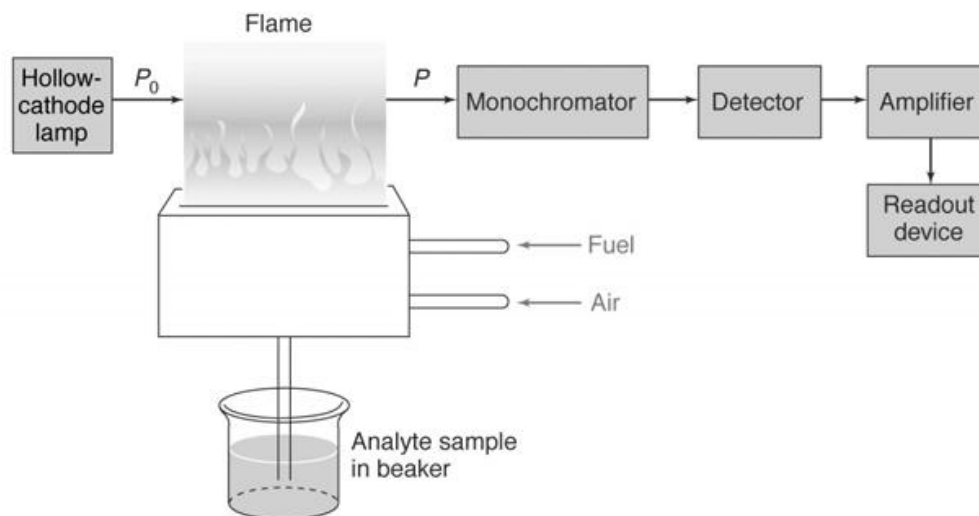


FIGURA 9. Esquema, Espectroscopia de Absorción Atómica

5.9.2. Minerales en las plantas

Las plantas además de producir sustancias químicas que ocasionan efectos fisiológicos, también son fuentes de vitaminas y oligoelementos como el magnesio, calcio, fósforo, hierro, silicio, cobalto, sodio entre otros; cada mineral cumple una función específica, y la carencia o exceso del mismo puede producir signos en las hojas, tallo o salud de la planta.⁵⁵

Los nutrientes minerales esenciales para las plantas son aquellos:⁵⁶

1. Necesarios para la ocurrencia de un ciclo de vida completo.
2. Involucrados en funciones metabólicas o estructurales en las cuales no pueden ser sustituidos.
3. Cuya deficiencia se asocia a síntomas específicos.

Las hojas y sus partes representan la inversión de los recursos nutricionales de las plantas en procesos fisiológicos, ligados al intercambio gaseoso (asimilación fotosintética del CO_2 , transpiración). La composición química típica de la materia seca de una hoja puede ser 60% Carbohidratos, 25% Proteínas, 5% Lípidos y 10% Minerales. El destino fisiológico de estos minerales es variado y dependen de las relaciones fuente-sumidero y de la especificidad de las funciones desempeñadas por cada mineral.⁵⁶

5.9.2.1. Clasificación de los nutrientes minerales

Los elementos esenciales se puede clasificar según: ⁵⁶

1. La concentración de la planta (TABLA 6).
2. La función bioquímica o biológica.
3. La movilidad y translocación en la planta.

TABLA 6. Clasificación de los elementos esenciales según su concentración en la planta. ⁵⁷

MACRONUTRIENTES		MICRONUTRIENTES
Primarios	Secundarios	
Nitrógeno (N) Fósforo (P) Potasio (K)	Calcio (Ca) Magnesio (Mg) Azufre (S)	Hierro (Fe)
		Cobre (Cu)
		Zinc (Zn)
		Cloro (Cl)
		Manganeso (Mn)
		Molibdeno (Mo)
		Boro (B)

5.9.2.2. Manganeso

La función del manganeso está basada en la evolución del oxígeno fotosintético. En las reacciones del Fotosistema II, la molécula de agua es descompuesta por una deshidrogenasa que es activada por un ión manganeso. Como producto de esta reacción se libera O₂ y los átomos de hidrógeno son enviados a la plastoquinona para iniciar el transporte de electrones de la fotosíntesis. Además se sabe que es imprescindible en la síntesis de la molécula de clorofila. ⁵⁸

El manganeso es absorbido como un catión divalente (Mn²⁺) y su rango de pH óptimo es de 5 a 7. La deficiencia del mismo se muestran primero en las hojas jóvenes, donde se observa una clorosis caracterizada por la aparición de manchas amarillentas y necróticas entre las nervaduras. ⁵⁸

5.9.2.3. Zinc

El zinc actúa tanto como un componente metal de enzimas, como un cofactor funcional, estructural o regulatorio de un gran número de enzimas. Es absorbido como un catión divalente (Zn^{2+}) y su pH óptimo es de 5 a 7. La deficiencia del mismo, causa la reducción del tamaño de la planta en general, provocado por una reducción de los entrenudos.⁵⁸

5.9.2.4. Hierro

La función del hierro en el metabolismo de la planta se debe a la facilidad de este elemento para reducirse (Fe^{3+}) y oxidarse (Fe^{2+}). El hierro forma parte de dos grupos de proteínas, las hemoproteínas y hierro-azufre, de esta última la más importante es la ferredoxina, que participa en las reacciones lumínicas de la fotosíntesis.⁵⁸

Por ser un elemento pesado y poco soluble, los principales síntomas de deficiencia se presentan en las hojas y consiste en una clorosis con las nervaduras principales y secundarias de color verde.⁵⁸

5.9.2.5. Cobre

Es absorbido en forma de ión cúprico (Cu^{2+}) y puede ser absorbido como una sal de un complejo orgánico como el EDTA. El cobre está presente en tres diferentes formas en las proteínas: proteínas azules, que no tienen actividad oxidativa y cuya función es de transferencia de un electrón; proteínas no-azules, las cuales producen peroxidasas y oxidan monofenoles a difenoles; y proteínas multicobre, que contiene al menos cuatro átomos de cobre por moléculas y actúan como oxidasas.⁵⁸

La deficiencia de cobre en los cereales, provoca una clorosis o amarillento y rizado de la lámina foliar; en cítricos, ocurre un marchitamiento de los brotes nuevos y en ocasiones la lámina de la hoja muestra coloraciones azuladas.⁵⁸

5.9.2.6. Metales pesados en las plantas

Son elementos químicos que presentan alta densidad y son tóxicos inclusive en concentraciones muy bajas, por ejemplo alguno de estos elementos son: el plomo (Pb), mercurio (Hg), cromo (Cr), cadmio (Cd), entre otros. Estos metales se encuentran como componentes naturales de la corteza terrestre, presentes en forma de minerales, sales u otros componentes; se sabe que no pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural ya que no presentan funciones metabólicas específicas para los seres vivos.

Dentro de los metales pesados, denominados oligoelementos, son requeridos en pequeñas cantidades y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital (Cu, Cr, Fe, Mn y Zn).

Cuando el contenido de metales pesados en el suelo alcanza niveles que rebasan los límites máximos permitidos causan efectos inmediatos como inhibición del crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, y un disturbio funcional en otros componentes del ambiente así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo (TABLA 7).^{59; 60}

TABLA 7. Concentración de los macro y micronutrientes expresados en miligramo por kilogramo o ppm en las plantas.⁷⁸

ELEMENTO	CONTENIDO MINERAL (mg Kg ⁻¹ PS)	NÚMERO DE ÁTOMO RELATIVO AL Mo
MICRONUTRIENTE		
Níquel (Ni)	0,05	1
Molibdeno (Mo)	0,1	1
Cobre (Cu)	6	100
Zinc (Zn)	20	300
Manganeso (Mn)	50	1 000
Hierro (Fe)	100	2 000
Boro (B)	20	2 000
Cloro (Cl)	100	3 000
MACRONUTRIENTES		
Azufre (S)	1 000	30 000
Fósforo (P)	2 000	60 000
Magnesio (Mg)	2 000	80 000
Calcio (Ca)	5 000	125 000
Potasio (K)	10 000	250 000
Nitrógeno (N)	15 000	1 000 000
Oxígeno (O)	450 000	30 000 000
Carbono (C)	450 000	40 000 000
Hidrógeno (H)	60 000	60 000 000

VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1. Materiales, Equipos y Reactivos

Reactivos y Materiales

Los reactivos, Folin-Ciocalteu y Quercetina Dihidratada fueron obtenidos de MERCK. Los reactivos, carbonato de sodio y caolín PZ-400 fueron obtenidos de RIEDEL – DEHAËN AG. El indicador Índigo de Carmín y el reactivo 2,2-Difenil-1-1picrilhidrazol (DPPH) fueron obtenidos de SIGMA – ALDRICH. Los reactivos, permanganato de sodio y oxalato de sodio fueron obtenidos de BAKER ANALYZED. La gelatina y agar nutritivo deshidratado, fueron obtenidos de MOVILAB y BRITANIA S.A. respectivamente. El reactivo cloruro de sodio fue obtenido de SCHARLAU CHEMIE S.A. Finalmente se menciona que los solventes empleados fueron de grado reactivo analítico.

- Salkowski
- Liebermann – Burchard
- Shinoda
- Bornträger
- Cloruro Férrico
- Agua de Bromo
- Acetato de plomo al 5%
- Hidróxido de sodio al 5%
- Hidróxido de sodio al 10%
- Hidróxido de sodio al 20%
- Fehling
- Alcohol isoamílico
- Dragendorff
- Mayer
- Wagner
- Otto

Equipos

- Espectrofotómetro UV - Vis (THERMO SCIENTIFIC HEXIOSY)
- Lámpara UV (COMPACT UV LAMP 254/365 nm)
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica (AA – 6800 SHIMADZU)
- Balanza Analítica (SHIMADZU AUW120, max:120g – min: 10g)

6.2. Procedimiento

6.9.1. Recolección y Selección de la muestra

Las hojas de la especie *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst fue recolectada en el distrito de Yucaj, provincia de Urubamba, departamento del Cusco, durante las épocas de Agosto a Noviembre.

Las hojas muestreadas fueron llevadas a la estufa para ser secadas a 32 °C durante 72 horas; una vez secas fueron molidas y colocadas en frascos para su mejor conservación y posterior estudio.

6.9.2. Tratamiento de la muestra

Se utilizó 120 gramos de hojas secas y molidas, las cuales fueron desengrasadas con el solvente bencina de petróleo empleando un equipo Soxhlet, posteriormente fue llevado a una estufa para ser secado durante 24 horas a 32 °C; el material desengrasado se guardó en un frasco para su posterior utilización.

6.9.3. Obtención de los Extractos con Polaridad Creciente

Se realizó la extracción con solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol respectivamente. Para obtener dichos extractos se pesó 50 gramos de hojas, se colocó en un frasco ámbar de boca ancha, se añadió 90 mL de n-hexano y se almacenó en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante una semana con agitación frecuente; culminado el tiempo, se filtró empleando el equipo de bomba de vacío. Finalmente el filtrado se concentró a 32°C en una estufa durante 4 días aproximadamente hasta peso constante.

El residuo del papel filtro se llevó a secar a 32°C en una estufa durante 48 horas, hasta peso constante, una vez seco se continuó con el siguiente solvente.

6.9.4. Análisis Fitoquímico de los extractos

Se realizó el análisis fitoquímico (Screening) preliminar para determinar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst. Posteriormente se realizó dicho análisis a cada extracto obtenido con polaridad creciente, cabe mencionar que los análisis respectivos de cada metabolito se realizaron por triplicado.⁶¹

6.9.4.1. Saponinas

6.9.4.1.1. Prueba de espuma

A una solución acuosa de hojas secas, se sometió a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de las saponinas es indicada por la formación de una espuma persistente durante 3 minutos.

6.9.4.1.2. Reactivo de Salkowski

A 2 mg de los extractos de n-hexano, cloroformo y acetato de etilo se añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 3 gotas de anhídrido acético, las coloraciones van del amarillo al rojo sangre, este reactivo indica la presencia de saponinas que pueden ser triterpenoidales o esteroidales.

6.9.4.1.3. Variante A de la reacción de Salkowski

Se disolvió 2 mg de cada extracto en cloroformo; se añadió 5 gotas de anhídrido acético refrigerado más una gota de ácido sulfúrico concentrado, por las paredes. La coloración es de rojiza-grosella para saponinas triterpénicas y azul-verdosa para saponinas esteroidales.

6.9.4.1.4. Variante B de la reacción de Salkowski

Se disolvió 2 mg de cada extracto en cloroformo; se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Si el color obtenido va del rojo azulado hasta el púrpura se le considera saponinas esteroidales y si es rojo colesterol.

6.9.4.1.5. Reactivo de Liebermann-Burchard

Se añadió 5 gotas de ácido acético más 2 mL de anhídrido acético/ ácido sulfúrico (50:1). Si el color va del rosado al púrpura serán saponinas triterpenoidales mientras que la esteroidales da azul-verdoso.

6.9.4.2. Flavonoides

6.9.4.2.1. Reactivo de Shinoda

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se añadió una limadura de magnesio y 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se observa un intenso burbujeo por la reacción de la limadura y la solución adquiere una débil coloración naranja al principio; conforme va reaccionando la coloración naranja se va intensificando, lo que indica la presencia de flavonoides.

6.9.4.2.2. Reacción con cloruro férrico

Se añadió 2 gotas de cloruro férrico al extracto etanólico y metanólico. La aparición de un color verde negruzco indica la presencia de compuestos fenólicos.

6.9.4.2.3. Reacción con NaOH 20%

Se añadió 5 gotas de hidróxido de sodio al 20% al extracto etanólico y metanólico, se obtiene un cambio de coloración.

6.9.4.3. Taninos

6.9.4.3.1. Reacción con gelatina-cloruro de sodio

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se añadió 3 gotas de gelatina- cloruro de sodio, en un principio se forma una sustancia en forma de nube en la solución, luego de centrifugar se observó un precipitado de color blanco. Éste confirma la presencia de taninos.

6.9.4.3.2. Reacción con cloruro Férrico o alumbre férrico

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se le añade 2 gotas de cloruro férrico, una coloración negra azulada indica la presencia de taninos pertenecientes a los derivados del ácido pirogálico y si da una coloración verde es derivado de la catequina.

6.9.4.3.3. Reacción de precipitación con agua de bromo

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se añadió 5 gotas de agua de bromo. La formación de un precipitado indica la presencia de un tanino catéquico o flobatanino.

6.9.4.3.4. Reacción con formaldehído

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se añadió 1 mL de formaldehído y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se calentó en bañomaría; si precipita totalmente el tanino pertenece a la clase catéquica. Los taninos pirogálicos en las mismas condiciones dan compuestos parcialmente solubles.

6.9.4.3.5. Reacción con acetato de plomo

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se añadió 1 mL de acetato de plomo 5%, observa la presencia de un precipitado, este es separado y se le añadió 5 gotas de ácido acético diluido y al filtrado se le agregó 2 gotas de cloruro férrico.

Todos los taninos naturales precipitan completamente con el acetato de plomo en solución neutra, de modo que el filtrado no de reacción con una sal férrica. El precipitado de taninos catéquicos o flobataninos, se disuelve en ácido acético diluido, mientras que el precipitado de los galotaninos es total o parcialmente insoluble.

6.9.4.4. Antocianinas - Betalaínas

6.9.4.4.1. Adición de álcali: NaOH 20%

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se le añade 5 gotas de hidróxido de sodio al 20%, la decoloración lenta de violeta, azul, verde y amarillo indica fenolatos alcalinos. Una decoloración rápida a amarillo es para el caso de betacianinas.

6.9.4.4.2. Reacidificación: HCl 1N

A la solución anterior se le añadió 1 mL de ácido clorhídrico 1N. La regeneración del color rojo indica la presencia de antocianinas.

6.9.4.4.3. Adición de amoníaco

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se le añade 5 gotas de amoníaco, la decoloración rápida de violeta a amarillo para antocianinas.

6.9.4.4.4. Adición de HCl 1N

La solución da un rojo más claro para antocianinas y un violeta más oscuro para betacianinas.

6.9.4.4.5. Alcohol isoamílico-agua

A 1 mL del extracto etanólico y metanólico se añadió 1 mL de alcohol isoamílico y agua; la fase alcohólica adquiere una coloración rojiza a pH ácido para antocianina y en el caso de betacianina no ocurre se observa tal coloración.

6.9.4.5. Quinonas

6.9.4.5.1. Reacción con NaOH al 5%

Se pesó 2 mg del extracto etanólico y metanólico, se añadió 0,2 mL de etanol y 0,4 mL de NaOH al 5%, el cambio de coloración indica la presencia de compuestos quinónicos.

6.9.4.5.2. Reacción de Borntränger

A 2mg del extracto etanólico y metanólico, se añadió KOH 5% en caliente, se filtró, en frío se aciduló con HCl al 20%, luego de agregar el benceno se agito y se dejó en reposo. Luego se separó la fase bencénica a la cual se la añadió NH_4OH . La formación de una coloración rosada a roja, indicaría la presencia de antraquinonas.

6.9.5. Método Espectrofotométrico para la Determinación Cuantitativa de Flavonoides Totales expresados como Quercetina

6.9.5.1. Curva de Calibración del Patrón Quercetina

Se preparó una solución de quercetina (0,0025 gramos de quercetina dihidratada en 25 mL de etanol al 96%) de 100 ppm. A partir de esta se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 4, 5, 10, 12, 15, 16, 17 ppm. Se leyó a 255 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

6.9.5.2. Determinación Cuantitativa de Flavonoides Totales

La determinación cuantitativa de flavonoides totales, fue realizada según el método descrito por Kostennikova Z. Se pesó 0,5 gramos, de hojas desengrasadas, las cuales fueron transferidas a un balón de 250 mL y se añadió 20 mL de ácido sulfúrico al 10% más 20 mL de etanol al 50%, se utilizó la técnica de reflujo por el lapso de 2 horas.

Culminado el tiempo se filtró empleando el vacío; el residuo se lavó con 30 mL de etanol al 50% para desecharlo finalmente. El filtrado fue evaporado en bañomaría (40°C) hasta la mitad del volumen inicial, se enfrió sobre un baño de hielo por 30 minutos y posteriormente se filtró, lavando el precipitado formado con 40 mL de agua destilada fría (10-15°C). Se eliminó el filtrado y los lavados, el residuo tanto del filtro como del recipiente se disolvió con 70 mL de etanol al 96%, calentado previamente a 50 °C; la solución fue transferida a una fiola de 100 mL y se enrazó con etanol al 96%. Finalmente se leyó las absorbancias a 255 nm, este método fue realizado por triplicado (\pm Desviación estándar).^{62; 63}

La expresión empleada para el cálculo fue la siguiente:

$$X = \frac{(A_m)(P_R)(5)}{(A_R)} \times 100$$

Donde:

X = Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina (mg quercetina / g muestra)

A_m = Absorbancia de la solución muestra (nm)

P_R = Peso de la sustancia patrón o referencia (g)

A_R = Absorbancia de la solución patrón o referencia (nm)

6.9.6. Método de Lowenthal para Taninos

6.9.6.1. Solución Estandarizada de Permanganato de Potasio 0.1N

Se realizó una titulación utilizando ácido tánico como patrón con permanganato de potasio 0.1N. Se pesó 0,1 gramos de ácido tánico, 20 mL de índigo carmín como indicador y 750 mL de agua destilada. Se tituló hasta la aparición del color amarillo oro. Se realizó un blanco reactivo. ²⁸

6.9.6.2. Contenido de Taninos Totales

Se pesó 2 gramos de hojas, aproximadamente, y se reflujo con 200 mL de agua destilada por 4 horas. Posteriormente fue filtrado, se tomó una alícuota de 25 mL y se transfirió a un matraz de 1000 mL más 20 mL de índigo carmín y 750 mL de agua destilada. Se tituló con KMnO_4 0.1N hasta observar una coloración amarilla dorada. Se realizó un blanco reactivo; fue realizado por triplicado.

6.9.6.3. Contenido de no Taninos

Se tomó una alícuota de 100 mL de la solución acuosa obtenido luego del reflujo, se añadió 50 mL de la solución de gelatina y 100 mL de cloruro de sodio ácido (25 mL de ácido sulfúrico concentrado más 975 mL de cloruro de sodio saturado) y 20 gramos de caolín. Se agitó y se dejó reposar durante 20 minutos.

Se tomó 25 mL de la solución anterior más 20 mL del indicador índigo carmín y 750 mL de agua destilada. Se tituló con KMnO_4 0.1N hasta observar una coloración amarilla dorada. Se realizó un blanco reactivo; fue realizado por triplicado. Los resultados se expresaron como gramos de ácido tánico /100 gramos de muestra (\pm Desviación estándar).^{28; 64}

6.9.7. Fenoles Totales

6.9.7.1. Curva de Calibración de Contenido de Fenoles Totales

Los fenoles totales se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como patrón.

Se preparó una disolución de ácido gálico de 100 mg/L, de la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20% y una disolución 1N del reactivo de Folin Ciocalteu, por medio de una dilución del reactivo comercial, el cual es 2N, en agua destilada; el reactivo se protegió de la luz.

Utilizando la disolución patrón de ácido gálico, en viales de color ámbar de 10 mL, se prepararon diluciones para obtener concentraciones de 0 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 6mg/L, 9mg/L; se tomó respectivamente 80 μL , 240 μL , 480 μL y 720 μL de la disolución patrón de ácido gálico de 100 mg/L y se adicionó a cada vial 250 μL del reactivo Folin Ciocalteu 1N, se agitó durante 5 minutos, posteriormente se adicionó a cada vial 1250 μL de carbonato de sodio al 20%, se llevó a un volumen final de 8 mL con agua destilada y se dejó en reposo por 1h. Se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico. Culminado el tiempo se leyó la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro de UV-Vis. Se realizó por triplicado.

6.9.7.2. Preparación del extracto metanólico

Se pesó 12 gramos de hojas secas y desengrasadas, se dejó macerar con metanol (60 mL) en un frasco ámbar a temperatura ambiente durante 5 días agitándolo cada día, se filtro y el filtrado se concentró a 32 °C durante 2 días en una estufa hasta peso constante.

6.9.7.3. Determinación del contenido de fenoles totales en el extracto metanólico

En una fiola de 100 mL se pesó 4 mg del extracto metanólico y se enrasó con metanol; se tomó 1 mL de esta disolución y se mezcló con 3,5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu, se dejó en reposo durante 5 minutos, después se añadió 3,5 mL de carbonato de sodio al 20%. Se agitó fuertemente y se dejó en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado (\pm Desviación estándar).

6.9.8. Capacidad Antioxidante

Se pesó 27,6 mg de 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH), el cual fue transferido a una fiola de 50 mL, se llevó a volumen con metanol. Luego se tomó una alícuota de 4 mL y se transfirió a otra fiola de 50 mL, el cual se llevó a volumen con metanol.

A partir del extracto metanólico seco, se pesó 10 mg y se disolvió con 10 mL de metanol (solución madre). Se prepararon soluciones de diferentes concentraciones a partir de alícuotas de la solución madre, con la finalidad de encontrar su respectivo factor de dilución; dicho factor se observó mediante la variación del color de púrpura a amarillo.

Conociendo el factor de dilución, a partir de la solución madre se realizaron diluciones sucesivas de 0,5; 1; 2; 2,5; 4; 5; 7; 8; 10; 15; 18 y 20 mg/L. En viales ámbar se agregó 100 μ L de cada dilución y 4900 μ L de DPPH. Se dejaron reposar en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada dilución a 517 nm.⁶⁵

$$\% \text{Inhibición} = \left(\frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{DPPH}}} \right) \times 100$$

Donde:

- A DPPH = Absorbancia del DPPH
- A Muestra = Absorbancia de la muestra con DPPH

Además se determinó la concentración requerida para el 50 % de inhibición del radical DPPH (IC₅₀), calculada mediante la ecuación de la gráfica Concentración vs % Inhibición. Los resultados son expresados como porcentaje de IC₅₀ en microgramos/mililitros (\pm Desviación estándar).

6.9.9. Determinación de la Actividad Antimicrobiana

6.9.9.1. Obtención de cepas

Las cepas utilizadas en la determinación de la actividad antimicrobiana en el extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, están depositadas en el American Type Culture Collection (ATCC).

- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076)
- *Candida albicans* (ATTC 10231)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862)

6.9.9.2. Medios de cultivo

Se utilizó medios de cultivo ricos que permitieron el crecimiento de los microorganismos, siendo este agar nutritivo. Se añadió 31 gramos de agar nutritivo a 1 L de agua destilada, se disolvió en caliente y se esterilizó mediante el método calor húmedo (ebullición) durante 30 minutos. Se distribuyó en placas Petri previamente esterilizadas a 180 °C durante 45 minutos en una estufa.⁶⁶

6.9.9.3. Determinación de la Actividad Antimicrobiana

Se pesó 20 gramos de hojas secas y desengrasadas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, se añadió 200 mL de agua destilada previamente calentada a 40 °C, se dejó reposar durante 1 hora y se filtró, posteriormente se llevó a concentrar a 32 °C durante 4 días. A partir del extracto se prepararon soluciones de 5%, 15%, 25%, 50% y 75%.

Se prepararon los cultivos del microorganismo en caldo nutritivo y se incubaron por un lapso de 24-48 horas a 37 °C para las bacterias y a 28-30 °C por 24 a 72 horas para hongos y levaduras. Luego empleando un asa de siembra se inocularon los microorganismos en tubos con agar nutritivo en plano inclinado y se incubaron por el mismo lapso de tiempo; estos fueron usados como patrones. Finalmente a partir de los microorganismos en plano inclinado, empleando un asa de siembra se inocularon en caldo nutritivo para ser usados.

Con las placas Petri con el agar nutritivo, se realizaron 4 pocillos de 5 mm de diámetro, a partir de los microorganismos presentes en el caldo nutritivo, con ayuda de un hisopo estéril se extrajo una alícuota y se sembró por diseminación, sobre el agar nutritivo presente en la placa Petri, se agregó 100 µL de cada extracto acuoso en cada uno de los pocillos y se dejó incubar a 37°C durante 24 horas, finalmente se determinaron los resultados mediante el desarrollo del diámetro del halo de inhibición del microorganismo en estudio. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada cepa y para cada concentración (\pm Desviación estándar). ⁶⁶

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición (mm)} - \text{Diámetro del disco (5 mm)}}{\text{Diámetro de inhibición}} \times 100$$

6.9.10. Determinación de Humedad

A partir de de las hojas frescas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, se pesó 6 gramos en un crisol previamente pesado, se llevó a la estufa a 110 °C durante 2 horas, posteriormente se trasfiere el crisol a un desecador hasta que se encuentre a temperatura ambiente, finalmente se llevó a pesar. Este procedimiento fue realizado por triplicado.

6.9.11. Determinación del contenido de ceniza

Luego de haber sido pesado el crisol para determinar el contenido de humedad en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, se llevó el crisol a la mufla a 550 °C durante 4 horas. Este procedimiento se realizó por triplicado.

6.9.12. Determinación de Metales mediante Absorción Atómica

A partir de los estándares certificados de 1000 mg/L, se realizaron las curvas de calibración de los siguientes metales: hierro (Fe), zinc (Zn), sodio (Na), manganeso (Mn), cobre (Cu), plomo (Pb) y cromo (Cr).

Digestión por vía seca:

Se disolvió las cenizas completamente en 5 mL de ácido nítrico concentrado y 5 mL de agua desionizada (primera digestión hasta casi sequedad), para la total eliminación de materia orgánica se añadió 2 mL de ácido perclórico (segunda digestión). Se filtró y transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL; se realizó la determinación por el método de absorción por flama. Este procedimiento se realizó por triplicado.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Rendimiento de los Extractos con Solventes de Polaridad Creciente

Se llevó a cabo la determinación del rendimiento en cada extracto, para las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, utilizando solventes de menor a mayor polaridad, siendo estos: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol. De acuerdo a los resultados, el extracto metanólico presenta mayor rendimiento, esto indica que la mayoría de los componentes de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst tienen una mayor afinidad por los solventes polares. En el caso de los extractos de n-hexano y acetato de etilo nos indica la presencia de metabolitos secundarios de carácter apolar confirmando la presencia de saponinas. Mediante estos resultados se determinó trabajar con extractos metanólicos para el caso de taninos y flavonoides (TABLA 8).

TABLA 8. Rendimiento de los extractos con solventes de polaridad creciente

	RENDIMIENTO DE CADA EXTRACTO (%)
n-HEXANO	3,42
CLOROFORMO	1,82
ACETATO DE ETILO	3,81
ETANOL	4,14
METANOL	8,51

7.2. Análisis Fitoquímico de los Extractos Secos con Polaridad Creciente**7.2.1. Saponinas**

TABLA 9. Ensayos para la determinación cualitativa de saponinas

EXTRACTO	ENSAYOS	METABOLITO SECUNDARIO	HOJAS
n-HEXANO	PRUEBA DE ESPUMA	SAPONINA	++
	SALKOWSKI		++
	VARIANTE A SALKOWSKI	SAPONINA ESTEROIDAL	++
	VARIANTE B SALKOWSKI		++
	LIEBERMANN - BURCHARD		+
CLOROFORMO	PRUEBA DE ESPUMA	SAPONINA	+++
	SALKOWSKI		+++
	VARIANTE A SALKOWSKI	SAPONINA ESTEROIDAL	+++
	VARIANTE B SALKOWSKI		+++
	LIEBERMANN - BURCHARD		+++
ACETATO DE ETILO	PRUEBA DE ESPUMA	SAPONINA	+++
	SALKOWSKI		+++
	VARIANTE A SALKOWSKI	SAPONINA ESTEROIDAL	+++
	VARIANTE B SALKOWSKI		+++
	LIEBERMANN - BURCHARD		+++

7.2.2. Flavonoides**TABLA 10.** Ensayos para la determinación cualitativa de flavonoides

EXTRACTO	ENSAYOS	METAOLITO SECUNDARIO	HOJAS
ETANOL	SHINODA	FLAVONOIDE	++
	FeCl ₃	COMPUESTOS FENÓLICOS	++
	NaOH 20%	FLAVONOIDE	++
METANOL	SHINODA	FLAVONOIDE	+++
	FeCl ₃	COMPUESTOS FENÓLICOS	+++
	NaOH 20%	FLAVONOIDE	+++

Ausente (-) Pequeñas cantidades (+) Moderado (++) Abundante (+++)

7.2.3. Taninos**TABLA 11.** Ensayos para la determinación cualitativa de taninos

EXTRACTO	ENSAYOS	METABOLITO SECUNDARIO	HOJAS
ETANOL	GELATINA – NaCl	TANINO	++
	FeCl ₃	TANINO CATÉQUICO	++
	AGUA DE BROMO		++
	FORMALDEHÍDO		++
	ACETATO DE PLOMO		++
METANOL	GELATINA – NaCl	TANINO	+++
	FeCl ₃	TANINO CATÉQUICO	+++
	AGUA DE BROMO		+++
	FORMALDEHÍDO		+++
	ACETATO DE PLOMO		+++

Ausente (-) Pequeñas cantidades (+) Moderado (++) Abundante (+++)

7.2.4. Antocianinas – Betalaínas**TABLA 12.** Ensayos para la determinación cualitativa de antocianinas - betalaínas

EXTRACTO	ENSAYOS	METABOLITO SECUNDARIO	HOJAS
ETANOL	ADICIÓN DE ÁLCALI NaOH 20%	FENOLATOS ALCALINOS	++
	HCl 1N	SAL DE OXONIO	-
	AMONÍACO	ANTOCIANIINAS	++
	ALCOHOL ISOAMILICO- AGUA		-
METANOL	ADICIÓN DE ÁLCALI NaOH 20%	FENOLATOS ALCALINOS	+++
	HCl 1N	SAL DE OXONIO	-
	AMONÍACO	ANTOCIANIINAS	+++
	ALCOHOL ISOAMILICO- AGUA		-

Ausencia (-) Pequeñas cantidades (+) Moderado (++) Abundante (+++)

7.2.5. Quinonas**TABLA 13.** Ensayos para la determinación cualitativa de quinonas

EXTRACTO	ENSAYOS	METABOLITO SECUNDARIO	HOJAS
ETANOL	NAOH 5%	QUINONAS	+++
	BORNTRÄGER	ANTRAQUINONAS	-
METANOL	NAOH 5%	QUINONAS	++
	BORNTRÄGER	ANTRAQUINONAS	-

Ausencia (-) Pequeñas cantidades (+) Moderado (++) Abundante (+++)

El análisis fitoquímico realizado a los extractos con diferentes polaridades (menor a mayor polaridad), muestra la presencia de saponinas en mayor proporción en los extractos apolares: n-Hexano, cloroformo y acetato de etilo (TABLA 9).

Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilo formando glicósidos son polares, debido a ello son solubles en solventes ligeramente polares como el acetato de etilo o en solventes de mayor polaridad como son el etanol y el metanol; debido a ello es que los flavonoides se encuentran en mayor abundancia en los extractos etanólicos y metanólico (TABLA 10). En el caso de los taninos al ser metabolitos polares son mejor extraídos por solventes de la misma polaridad, es por ello que se muestran abundantes en extractos alcohólicos (TABLA 11).

De esta manera el análisis fitoquímico nos indica que los metabolitos presentes en mayor proporción en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johns, son las saponinas, taninos y flavonoides.

En el caso de quinonas es posible determinarlas en extractos etanólicos y metanólicos. Sin embargo todos los extractos son negativos para la presencia de cumarinas y alcaloides.

7.3. Método Espectrofotométrico para la Determinación Cuantitativa de Flavonoides Totales expresados como Quercetina

Se realizó la determinación cuantitativa de flavonoides totales, ya que este metabolito es de importancia para la salud de los seres humanos y es el principal metabolito que brinda las funciones medicinales en la planta, la presencia de dicho metabolito en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst es de 1,70 mg de quercetina por gramo de muestra, sin embargo mediante la bibliografía se muestra que mediante el método Dowd adaptado por Arvouet - Grand , Vennat , Pourrat , y Legret ; se obtuvieron valores mayores para la misma planta, aunque cabe resaltar que la planta procedía de Valparaíso, Chile según el artículo y sobre todo que es el único artículo encontrado relacionado con la especie en estudio (TABLA 14).^{69; 75}

TABLA 14. Determinación cuantitativa de flavonoides totales expresados como quercetina

DETERMINACIÓN	EXTRACTO ETANÓLICO
	HOJAS
	1,70
	0,0746
FLAVONOIDES TOTALES EXPRESADOS COMO QUERCETINA (mg quercetina / g muestra)	
Desviación estándar	

7.4. Método de Lowenthal para Taninos

Mediante el método de Lowenthal se produce la oxidación de los taninos al reaccionar con el permanganato de potasio (KMnO_4) en presencia del indicador índigo de carmín, el cual actuó como un regulador de la reacción. Como en la solución también existen otros compuestos que pueden estar presentes y oxidarse al producirse la reacción, se realizó una segunda valoración después de extraer los taninos de la solución, mediante la solución de gelatina saturada con cloruro de sodio ácido. La cantidad neta de taninos en el extracto acuoso se obtiene mediante la diferencia entre el valor de la primera y segunda valoración.

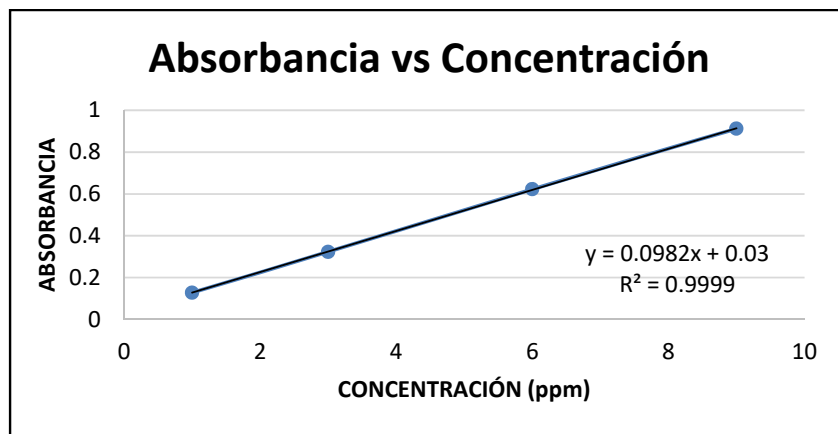
Como resultado se tiene que la cantidad de taninos en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst se encuentra en menor proporción (TABLA 15).⁶⁸

TABLA 15. Determinación cuantitativa de taninos por el método de Lowenthal

EXTRACTO ETANÓLICO	
DETERMINACIÓN	HOJAS
TANINOS (g ácido tánico / 100 g muestra)	1,03
Desviación estándar	0,1356

7.5. Fenoles Totales

La determinación de fenoles totales es realizada debido a la presencia de metabolitos secundarios como los taninos y flavonoides, los cuales son compuestos fenólicos encontrados en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst. El contenido de compuestos fenólicos en el extracto metanólico se muestra en la TABLA 16, estos resultados están expresados como miligramos de ácido gálico por 100 gramos muestra.



GRAFICA 1. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

TABLA 16. Determinación de fenoles totales en el las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

DETERMINACIÓN	EXTRACTO METANÓLICO
	HOJAS
FENOLES TOTALES (mg ácido gálico / 100 g muestra)	1,17
Desviación estándar	0,0129

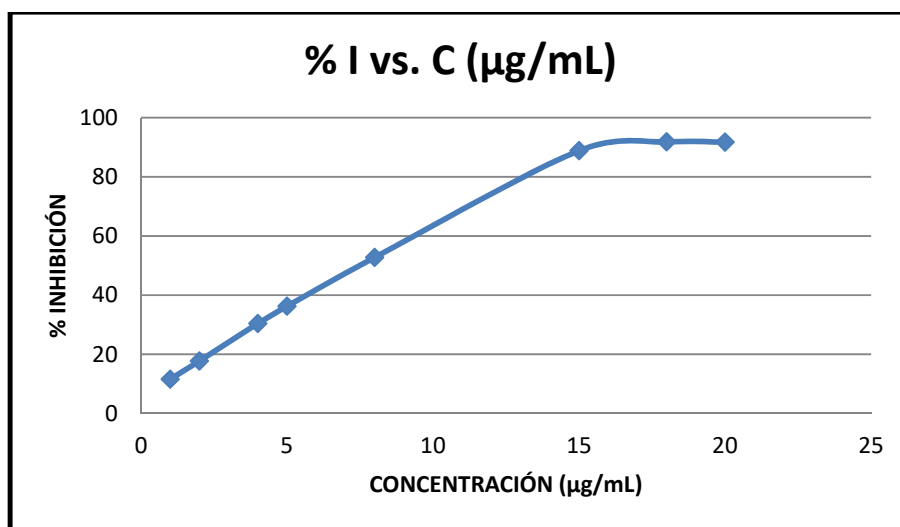
7.6. Capacidad Antioxidante

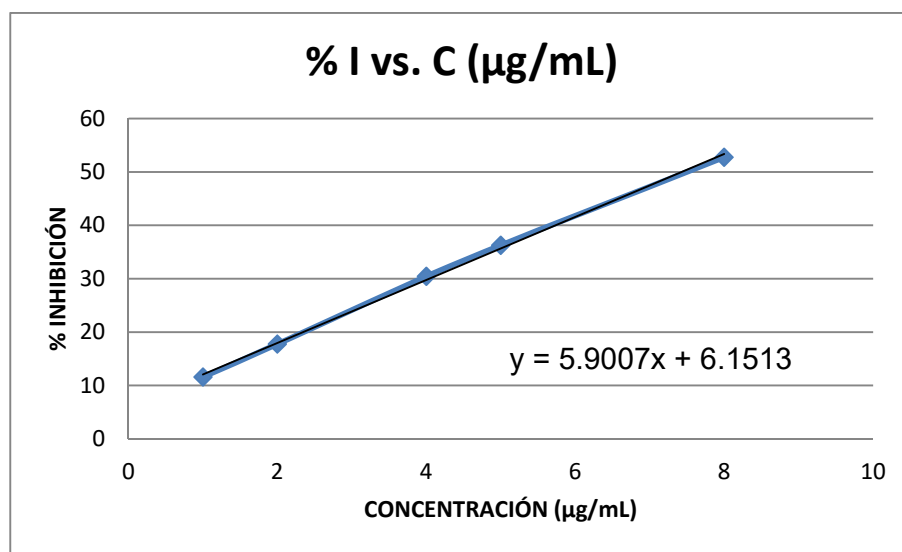
En la determinación de la capacidad antioxidante, se demuestra que para un extracto metanólico de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, se tiene un 91,72% de inhibición del radical DPPH, siendo un valor aceptable. Además de acuerdo al resultado obtenido de la concentración inhibitoria (IC_{50}), el cual es de 6,58 $\mu\text{g/mL}$, el extracto metanólico de las hojas de esta planta presenta una gran capacidad antioxidante y es por ello que se le atribuyen las diferentes propiedades medicinales anteriormente mencionadas.

Existe un estudio con el cual se puede comparar estos resultados, ya que trabajaron con extractos metanólico de las hojas de esta especie; dicho artículo hace mención a la determinación de la capacidad antioxidante, empleando el método del radical DPPH, la concentración inhibitoria (IC_{50}) reportada es de $2,19 \pm 0,01$, dicha muestra presenta una capacidad mayor que el resultado obtenido en este estudio; sin embargo hay que considerar las condiciones ambientales en las que se encuentran ambas plantas.⁷⁵

TABLA 17. Valores de las absorbancias (nm), concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) y porcentaje de inhibición (%)

EXTRACTO METANÓLCIO		
C ($\mu\text{g/mL}$)	ABSORBANCIA (nm)	%I
20	0,09	91,72
18	0,09	91,80
15	0,13	88,84
8	0,55	52,75
5	0,75	36,36
4	0,82	30,43
2	0,97	17,75
1	1,04	11,53
0,5	1,17	0,93

**GRAFICA 2.** Gráfica de dispersión, representa % Inhibición vs. Concentración ($\mu\text{g/mL}$)



GRAFICA 3. Análisis de regresión lineal para la determinación del parámetro IC_{50} (Concentración necesaria para inhibir en un 50% al radical DPPH)

TABLA 18. Concentración inhibitoria (IC_{50}) de DPPH en el extracto metanólico

EXTRACTO METANÓLICO	
	HOJAS
IC_{50} (µg/mL)	6.58
Desviación estándar	0,2112

7.7. Determinación de la Actividad Antimicrobiana

Los microorganismo utilizados fueron seleccionados de acuerdo a un artículo de referencia, en el cual mencionan que extractos de las ramas producen un efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Ya que en este estudio se emplearon las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, se desea determinar si el extracto acuoso de las hojas presentan una actividad similar contra estos microorganismo; además se decidió emplear cepas de *Salmonella enteritidis*.⁷⁰

Las cepas de *Staphylococcus aureus*, bacterias Gram positivas, pueden producir enfermedades que van desde infecciones cutáneas hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos meningitis, neumonía entre otros.⁷¹

Las cepas de *Escherichia coli*, enterobacteria Gram negativa, necesarias para el buen funcionamiento del proceso digestivo. Sin embargo esta bacteria puede causar infecciones intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, vías urinarias, cistitis, meningitis entre otras.⁷²

Al ser *Candida albicans* un hongo, presente en forma de levadura, es necesario que al determinar su actividad antimicrobiana se deje incubar por mayor tiempo (24 a 72 horas) en comparación con las demás cepas, las cuales se podían observar los resultados luego de 24 horas; normalmente este hongo se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina, este hongo está envuelto en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación. Finalmente en el caso de *Salmonella enteritidis*, bacteria Gram negativa, es conocido como un patógeno de las aves de corral.^{73; 74}

TABLA 19. Valores de los diámetros de los halos (Ø)

	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Ø DIÁMETRO DEL HALO (mm)	
5 %	3,5	ND
15%	4,0	ND
25%	4,5	5,3
50%	7,5	6,0
75%	9,75	7,4

No detectable (ND)

TABLA 20. Porcentaje de inhibición (%I) del extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	% Inhibición	
5 %	28,57	ND
15%	38,00	ND
25%	44,84	53,10
50%	66,67	58,62
75%	74,57	66,22

No detectable (ND)

Mediante estos resultados se observa que el extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, presentan actividad antimicrobiana sobre *Salmonella enteritidis* (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (Gram positiva); sin embargo los resultados no fueron favorables para las cepas de *Candida albicans* y *Escherichia coli* (FIGURAS 10, 11 y 12).

De acuerdo al porcentaje de inhibición el extracto acuoso presenta mayor actividad sobre *Salmonella enteritidis* desde el 5% hasta el 75%, en el caso de *Staphylococcus aureus* la actividad antimicrobiana se produce para altas concentraciones, por ende no se observó el halo para las concentraciones de 5% y 15% (TABLA 19 Y 20).

FIGURA 10. Ausencia de halos de inhibición frente a *Escherichia coli* por efecto del extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

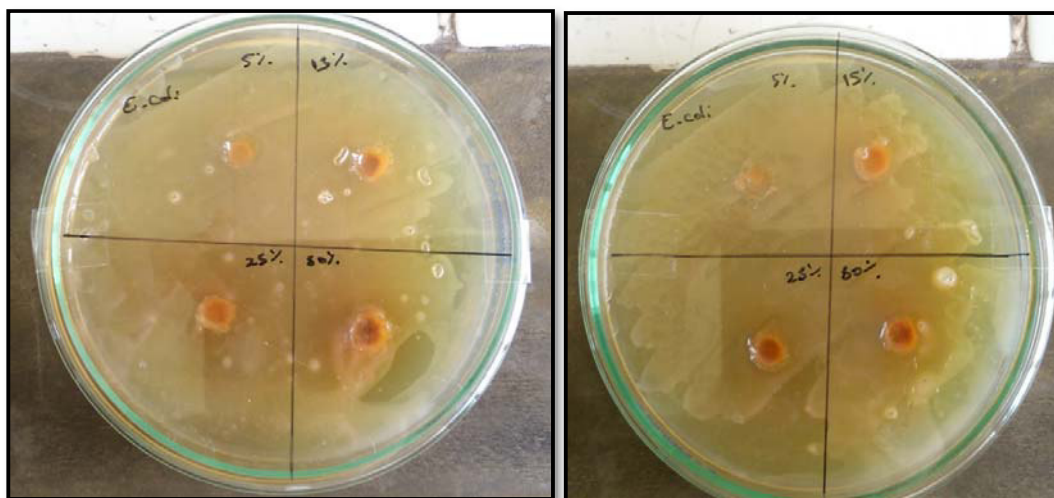


FIGURA 11. Halos de inhibición frente a *Salmonella enteritidis* por efecto del extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

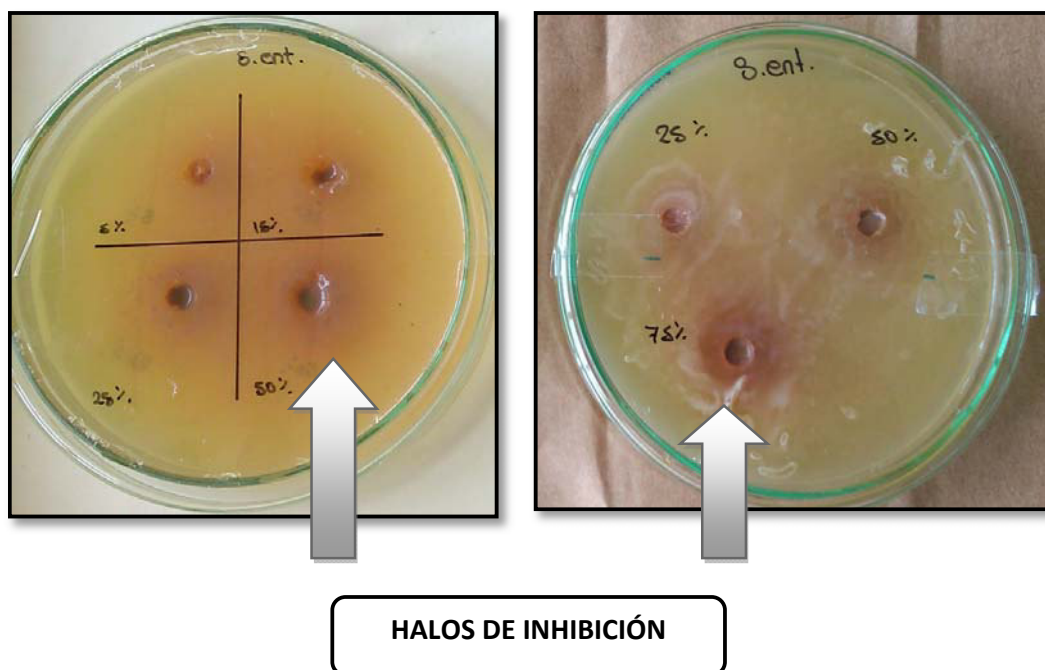
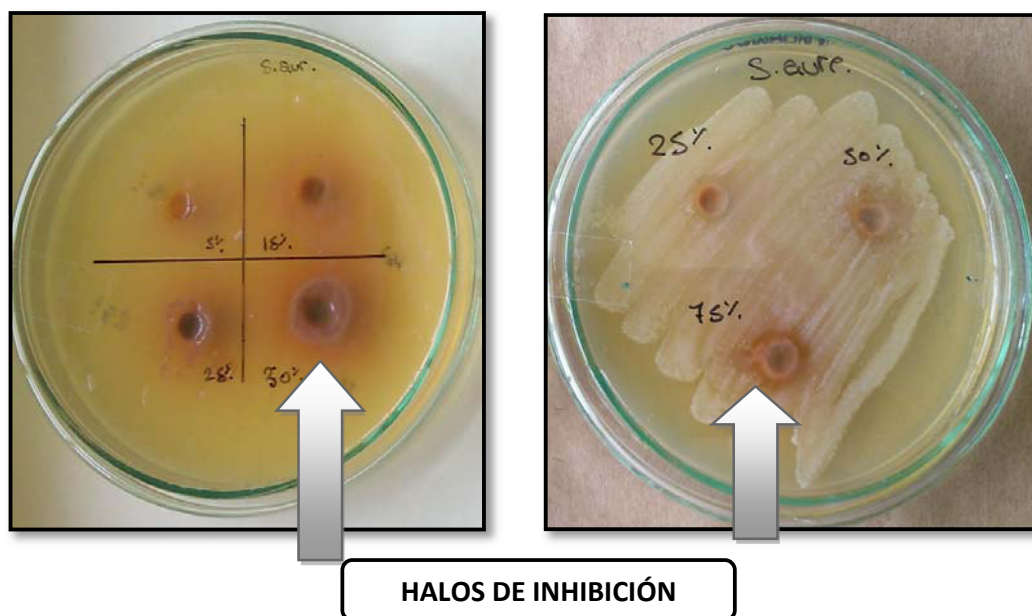


FIGURA 12. Halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* por efecto del extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst



7.8. Determinación del contenido de Humedad y Ceniza

Las plantas necesitan cierta cantidad de humedad ambiental para poder realizar la transpiración, mediante el cual expulsan agua a la atmósfera a través de las estomas encontrados en las hojas. La transpiración vegetal es importante, ya que la planta necesita absorber agua y nutrientes desde el suelo, además actúa como un regulador térmico.^{76; 77}

Las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, fueron traídas desde Yucay (Urubamba-Cusco) y presentan un porcentaje de humedad de 64,34% (TABLA 21).

TABLA 21. Valores del porcentaje de humedad y cenizas en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst

	HUMEDAD (%)	CENIZA (%)
HOJAS FRESCAS	64,34	3,3

7.9. Determinación de Metales mediante Absorción Atómica

Los micronutrientes son esenciales para el adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas, cuando existe la deficiencia de uno o varios elementos menores, estos se convierten en factores limitantes del crecimiento. Se determinó la concentración de algunos micronutrientes como el hierro (Fe), zinc (Zn), sodio (Na), Manganeseo (Mn) y cobre (Cu) además de dos metales pesados como el cromo (Cr) y plomo (Pb).

El análisis realizado a las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, nos muestra que los metales: cobre, cromo y plomo, no han sido detectados ya que el límite de detección para estos metales es de 0,5 ppm de acuerdo a la técnica usada (TABLA 22).

TABLA 22. Concentración en partes por millón (ppm) de los metales presentes en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

HOJAS (ppm)	
Hierro (Fe)	24,2
Zinc (Zn)	7,1
Sodio (Na)	807,9
Manganeso (Mn)	14,5
Cobre (Cu)	N.D.
Cromo (Cr)	N.D.
Plomo (Pb)	N.D.

7.10. TABLA COMPARATIVA

La relación que existe entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante es directamente proporcional (TABLA 23).

TABLA 23. Fenoles totales y capacidad antioxidante en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst

	EXTRACTO METANÓLICO
FENOLES TOTALES (mg ácido gálico/ 100g de muestra)	1,17
IC50 (µg/mL)	6,58

VIII. CONCLUSIONES

- El extracto metanólico presentó mayor rendimiento (8,51 %), es por ello que se empleó en la determinación de la capacidad antioxidante y en fenoles totales.
- Se comprueba mediante pruebas cualitativas, empleando las reacciones de coloración y precipitación para cada metabolito secundario; la presencia de taninos catéquicos, flavonoides y saponinas esteroidales como metabolitos secundarios mayoritarios en la muestra de hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.
- Respecto al método espectrofotométrico utilizado para la cuantificación de flavonoides totales (expresados como quercetina) se obtuvo 1,7 mg de quercetina en un gramo de muestra seca.
- Mediante el método volumétrico de Lowenthal para la cuantificación de taninos se obtuvo 1,03 g de taninos en 100 g de muestra seca.
- En fenoles totales se obtuvo 1,17 mg de ácido gálico/ 100 g de muestra, esto se debe a la presencia de flavonoides y taninos en las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.
- La concentración requerida para el 50 % de inhibición del radical DPPH (IC₅₀) fue de 6,58 µg/mL. Cuanto mayor sea el porcentaje de inhibición menor será el valor del IC₅₀.
- Las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, presentan actividad antimicrobiana sobre *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*, bacterias Gram negativa y positiva respectivamente. Sin embargo los resultados fueron negativos para las cepas de *Escherichia coli* y *Candida albicans*, al ser esta última una levadura la resistencia al ser atacada es mayor.

- En la determinación de minerales, el Hierro con un valor de 24,2 ppm se encuentra dentro del rango (24 a 20 ppm); sin embargo para el caso de Manganeseo (14,5 ppm), Cobre (menor a 0,5) y Zinc (7,1 ppm) presentan valores por debajo de los rangos establecidos (TABLA 23), convirtiéndose en factores limitantes del crecimiento.
- Las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst. no presentaron valores altos de metales pesados como el plomo y cromo ya que estos se encuentran en concentraciones por debajo de 0,5 ppm.

IX. RECOMENDACIONES

- Al concentrar los extractos o someterlos a bañomaría es recomendable mantener una temperatura menor de 40°C, para evitar la pérdida del metabolito secundario.
- En la determinación de flavonoides totales, es recomendable preparar las soluciones al instante, ya que se trabaja con soluciones de etanol al 50% y 96%, por acción del calor la concentración de las muestras puede variar, sobre todo si no son llevadas a leer el mismo día.
- En la determinación de fenoles totales es recomendable utilizar soluciones recién preparadas de Folin- Ciocalteu ya que este reactivo es fotosensible, de lo contrario afectaría en los resultados obtenidos.
- Realizar la lectura de la solución del DPPH al inicio del análisis, ya que para la determinación de la actividad antioxidante se recomienda una absorbancia en el rango de 1 nm a 1,4 nm.
- En la determinación de la capacidad antioxidante, leer las muestras con el DPPH, exactamente luego de haber culminado el tiempo de reposo (30 minutos) para obtener buenos resultados.
- En la determinación de la actividad antimicrobiana es recomendable trabajar con un solo tipo de cepa y en un ambiente esterilizado para evitar la contaminación cruzada y verificar el pH de la solución de agar nutritivo.
- Se recomienda el análisis de metales pesados por una técnica diferente a la de Flama, ya que la *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, crece a orillas del río Urubamba.
- Se recomienda la continuación de la investigación de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst, ya que es muy utilizada para diferentes tratamientos médicos; no solo las hojas son beneficiosos sino también las raíces, flores y frutos presentan diferentes usos como el teñido artesanal. Recomendando continuar el estudio de esta especie en flores, frutos y raíces, porque no presenta mucha investigación en nuestro país a pesar de ser una planta oriunda del Perú.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **CARTAYA, O.; REYNALDO, INÉS.** *“Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones”*, Cultivos Tropicales, vol. 22, núm. 2, 2001, pp.5-14. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.
2. **“FLORA DEL PERÚ- MINISTERIO DEL MEDIOAMBIENTE”.** Disponible en: www.minam.gob.pe.
3. **ESTHER F.S.; ROCÍO B.A.; PATRICIA C.R.** *“Determinación de la actividad antiinflamatoria y analgésica de los extractos etanólicos de la especie Muehlenbeckia volcánica (Benth.) End. (mullaca)”*, Dirección general de investigación única, 2009.
4. **PIERPOINT, W. S.** (1986) En: Ref. 1, P.125-40.
5. **LUCKNER, M.** *“Secondary Metabolism in Microorganism of Plants and Animals, Springer- Verlag”*, New York, p. 406-15 (1990).
6. **HARBONE, J.B.** *“Recent advances in chemical ecology”*, Nat. Prod. Rep. 6, 85-107 (1989).
7. **YAGYE GIL, A.** *“Los Taninos Vegetales”*, Instituto Forestal de Investigación y Experiencias, Madrid, 1969, p.43-48.
8. **CARMEN ALVAREZ A., OLGA LOCK DE UGAZ.** *“Taninos”*. Revista de Química, vol. 6, 1992, pp. 48.
9. **BRANDBYSE, S.** *“The genus Muehlenbeckia (Polygonaceae) in south and central América”*. Bot. Jahrl. Syst. 114 (3): 349- 416 (1992).
10. **BLANCA LEÓN.** *“Polygonaceae endémicas del Perú”*, Rev. Peru. Biol. Número especial 13(2), 2006, pp. 575s-576s, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.
11. **MUEHLENBECKIA HASTULATA (SM.) I.M.JOHNST.** Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University 81: 88.1928. [Fecha de acceso 1 de Febrero del 20016]. URL disponible: <http://www.tropicos.org>.
12. **MUÑOZ M., BARRERA M. AND MEZA I.** *“El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile”*, Publicación Ocasional núm. 33, Museo de Historia Natural de Santiago de Chile, 1981.

13. **MCKNIGHT W., DEL SOLDATO P., CALIGNANO A., CIRINO G. AND WALLACE J. L.** *“No-naproxen vs. naproxen ulcerogenic, analgesic and antiinflammatory effect”*
14. **J. ALBERTO MARCO.** *“Química de los productos naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario”*, 1^a ed. Madrid: Síntesis, 2006.
15. **ALMARAZ A. NORMA, ÁVILA R. JOSÉ ANTONIO, DELGADO A. ELÍ, NARANJO J. NESTOR, HERRERA C. JESÚS.** *“El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto”*.
16. **SEPÚLVEDA J. GABRIELA, PORTA D. HELENA, ROCHA S. MARIO.** *“La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas”*, Revista Mexica de Fitopatología, 2003; vol. 21, núm. 3, pp 355- 363.
17. **COSTA O. JORGE, LOCK DE UGAZ OLGA.** *“Los flavonoides como compuestos biológicamente activo”*, Revista de Química, 1993; vol 7, núm. 1, pp 73-86.
18. **MARTÍNEZ M., ALEJANDRO.** *“Flavonoides”*, Universidad de Antioquía, Medellín, Septiembre 2005.
19. **SALAH, N. Iet al.I.** *“Polyphenolic flavonols as scavenger of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidant”*, Arch. Biochem. Biophys., 1995, vol. 2, p. 339-346.
20. **HERTOG, M. G. L.; VAN POPPEL, G. P. Y VERHOEVEN, D.** *“Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables. En: Phytochemistry of Fruit and Vegetables”*, Oxford. Clarendon Press, 1007, p. 319-329.
21. **HAVSTEEN, B.** *“Flavonoids, a class of natural products ng high pharmaceutical potency”*, Biochem. Pharm. 32, 1141-8 (1983).
22. **YAGÏE GIL, A.** *“Los taninos vegetales”*, Instituto Forestal de Investigación y Experiencias, 1969, p. 48.
23. **OLGA LOCK DE UGAZ.** *“Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales”*, 2^{da} ed.; Pontificia Universidad Católica del Perú, 1994; pp 111-135.

24. **A. VALLE ELIANA, R. MALAGUTTI ANDRÉA, H. MAZO LUIZ, S.** “*Machado Sergio. Interação de íons cobre (II) com o flavonoide quercetina: um estudo espectroscópico e eletroquímico*”, Universidad de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, Brasil.
25. **VENEGAS CASANOVA, EDMUNDO A.** “*Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de Thea sinensis L. y su capacidad antioxidante*”, UCV- Scientia 4(2); 2012.
26. **GUTIÉRREZ GAITÉN YAMILET IRENE. Iet al. I.** “*Validación de 2 Métodos Espectrofométricos para la Cuantificación de Taninos y Flavonoides (Quercetina) en Psidium Guajaba*”, L. Rev Cubana Farm, 2000; 34 (1): 50-5.
27. **DE LA ROSA CATALINO. Iet al.I.** “*Cuantificación de Flavonoides Totales en el Extracto Metanólico de Glycine max (Soya) y su Efecto Larvicida contra Aedes aegypt*”, Revista Colombiana de Ciencias de la Salud. Vol. 1, núm. 1, 2012.
28. **CARRETERO A. MARÍA.** Compuestos fenólicos: Taninos. Panorama Actual Med. 200; 24 (235): 633-636.
29. **GIRÓN MORALES, JUAN JACOB.** “*Reutilización de la Salmuera en la etapa de salado del beneficio artesanal del maní (Arachis Hipogae L.) y cuantificación del contenido tánico en la testa- episgerma- de la semilla*”, Universidad de San Carlos de Gautemala, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, 2012.
30. “*Tannin in cloves and allspice Oficial Methods of Analysis of AOAC International*”, 16th Edition, 4th Revision, Titrimetric Method 9555.35, 1998.
31. Modificación de Carpené y Pi, resumido por J. García Barceló, Metodología de Análisis de Vinos y Derivados, (1975).
32. **GUTIERRES AVELLA, DORA MARINA, ORTIZ GARCIA CHRISTOPHER A., MENDOZA CISNEROS ARTURO.** “*Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*”, Universidad Autónoma de Querétero, 2008.
33. **DOMÍNGUEZ, X. A.** “*Métodos de Investigación Fitoquímica*”, John Wiley, México, 1973.
34. **LLENERA ANGEL.** “*Metabolitos Secundarios*”, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, 2011.

35. **JIMÉNEZ LÓPEZ PILAR, TOMÁS GIRBÉS JUAN.** *“Determinación del Contenido total de Polifenoles en Alimentos con el Reactivo de Folin-Ciocalteu”*, Nutrición y Bromatología; Facultad de Medicina; Universidad de Valladolid, 20013.
36. **BENAVIDES-MENDOZA, ADALBERTO.; RAMÍREZ, HOMERO; ROBLEDO-TORRES, VALENTÍN; FUENTES-LARA, LAURA.** *“Antioxidantes en las Plantas: Algunos Factores Edáficos y Ambientales que los Modifican”*, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, 2009.
37. **ALOMAR MARÍA FERNANDA.** *“Antioxidantes: captadores de radicales libres ó sinónimo de salud”*.
38. **CAPITÁN VENERO GUTIÉRREZ, JUSTO R.** *“Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes”*, Instituto Superios de Medicina Militar “Dr. Luis Días Soto”, Revista Cubana de Medicina Militar, Vol. 31(2): pp. 219-36, 2002.
39. **FEDERACIÓN CAFÉ,** Radicales libre y antioxidantes. Disponible en: <http://www.federacioncafe.com/Documentos/CafeYSalud/CafeYAntioxidantes/Radicales%20libres.pdf>.
40. **VERAS PACHECO, DANIELA.** *“Análisis de flavonoides en planyas medicinales del sur de Chhile con Técnica HPLC”*, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Escuela de Química y Farmacia, 2004.
41. **NAQUI A, BRITTON C, CADENAS E.** *“Reactive oxygen intermediates in biochemistry”*, Annu Rev Biochem 1996; 55: 137-66.
42. **BECKMAN JS, KOPPENAL WH.** *“Nitric oxide superoxide, and peroxinitrite- the god, the bad, and the ugly- Am J Physiol”* 1996; 40: C 1424- 37.
43. **DELGADO OLIVARES, LUIS; BETANZOS CABRERA, GABRIEL; SUMAYA MARTÍNEZ, MA. TERESA.** *“Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo”*, Investigación y Ciencia, núm. 50, 2010, pp. 10-15. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
44. **DORADO MARTÍNES, CLAUDIA; RUGERIO VARGAS, CONCEPCIÓN; RIVAS ARANCIBA, SELVA.** *“Estrés oxidativo y neurodegeneración”*, Rev. Fac. Med. UNAM, vol. 46, núm. 6, Noviembre-Diciembre, 2003.

45. **ELEJALDE GUERRA, J.I.** “Eestrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes”, AN. Med. INTERNA (Madrid), vol. 18, núm. 6, pp. 326-335, 2001.
46. **ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS: PRINCIPALES FUENTES Y SUS CONTENIDOS.** Disponible en:
<http://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes-en-alimentos/>.
47. **MUÑOZ JUÁREZ, M.A.; GUTIÉRREZ, D. M.** “Determinación de Actividad Antioxidante de Diversas Partes del Árbol *Nicotiana Glauca*”, Universidad Autónoma de Querétaro.
48. **MARTÍNEZ VÁSQUEZ JESICA BELINA.** “Evaluación de la Actividad Antioxidate de Extractos Orgánicos de Semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*”, Universidad Tecnológica de la Mixtec, 2007.
49. **MUEDAS TAPE, GOLFER; LA ROSA TORO GÓMEZ, ADOLFO; ROBLES CAYCHO, JUANA.** “Evaluación Electroquímica de la Actividad Antioxidante del Extracto Alcohólico de la *Bauhinia guianensis* var. *Kuntiana Aubl*”, Rev. Soc. Quím. Perú. 74 (4), 2008.
50. **MANTILLA, JOSÉ RAMÓN; SANABRIA, ANTONIO.** “Actividad Antibacteriana de Plantas Superiores Colombianas”. Disponibles en:
<http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V4N2P25-33.pdf>
51. **LIZACANO RAMÓN. ANDRE JIMENA; VERGARA GONZÁLEZ, JENNY LISSETH.** “Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y/o Aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* Frente a Microorganismos Patógenos y Fitopatógenos”, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2008.
52. **FLORES AGUILAR, LIDIA.** “Caracterización Fenotípica y Genotípica de Estirpes de *Salmonella Choleraesuis* Aisladas de Ambientes Marinos”. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/flores_al/antec.pdf
53. **BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK M.** “Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method”, The American Journal of Clinical Pathology, Department of Microbiology and Medicine, University of Washington, School of Medicine, vol. 45, núm. 4, pp. 493- 496, 1996.

54. **ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.** Disponible en:
http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/leia/choussy_c_d/apendice C.pdf
55. **ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.** Disponible en:
<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/lectura9.pdf>.
56. **CHUMACERO R., AÍDA.** *“Importancia de las Plantas en la Salud”*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Dpto. Botánica.
57. **NUTRICIÓN MINERAL DE LAS PLANTAS.** Disponible en:
<http://www.agroestrategias.com/pdf/Nutricion%20-%20Nutricion%20Mineral%20de%20las%20Plantas.pdf>.
58. **PROPIEDADES D ELOS NUTRIENTES EN LAS PLANTAS.** Disponible en:
<http://www.botanical-online.com/propiedadesnutrientes.htm>
59. **NUTRICIÓN MINERAL.** Disponible en:
http://fisiologiavegetal.mdelarosa.com.mx/6Nutricion_Mineral.pdf
60. **PRIETO MÉNDEZ, JUDITH; GONZÁLEZ RAMÍREZ, CÉSAR A.; ROMÁN GUITÉRREZ, ALMA D.; PRIETO GARCÍA, FRANCISCO.** *“Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua”*, Tropical and Subtropical Agroecosystems, vol. 10, núm. 1, 2009, pp. 29-44.
61. **NUTRICIÓN MINERAL EN PLANTAS (I).** Disponible en:
<https://cienciacebas.wordpress.com/2013/09/12/nutricion-mineral-en-plantas-i/>
62. **TÓMAS CHOTA, GLORIA EVA; HUAMÁN MALLA, JUANA MARÍA; LÓPEZ GABRIEL, JOSÉ LUIS.** *“Guía de Prácticas de Laboratorio de Productos Naturales”*, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química E Ingeniería Química, Escuela de Química, 2014.
63. **GUTIÉRREZ GAITÉN, YAMILET IRENE; MIRANDA MARTÍNEZ, MIGDALIA; VARONA TORRES, NOEL; TANIA RODRÍGUEZ, AIDA.** *“Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de Taninos y Flavonoies (Quercetina) en Psidium guajaba, L.”*, Rev. Cubana Farm. 2000; 34(1): 50-5.

64. **SOTO VÁSQUEZ, MARILÚ ROXANA.** “Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas”, In Crescendo. Institucional. 2015; 6(1): 33-43.

65. **KASAY, M. I.; HUAMÁN, J.; GUERRERO, M.** “Estudio cualitativo y cuantitativo de Taninos de la *Oenothera rosea* L’ HÉR. EX AITON”, Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 16, núm. 1, 2013. Pp. 13-19.

66. **TOLEDO NAUTO, MILAN.** “Estudio fitoquímico, evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la corteza de *Triumfetta semitriloba* Jacq (Motecepo) y análisis de parámetros reológicos del mucílago”, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela de Química, 2015.

67. **WOOLCOTT HURTADO, JUAN CARLOS.** “Guía de Prácticas de Microbiología Industrial”, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela de Química, 2015.

68. **GIBAJA OVIEDO, SEGUNDO.** “Pigmentos Naturales Quinóninos”, 1ª ed. Lima: UNMSN, Fondo Editorial; 1998.

69. **BAUTISTA FLORES, EMILIA CRISTINA; GONZALES VEGA, DAYSI EVELYN.** “Análisis cualitativo y cuantitativo de taninos en las cortezas de *Byrsonima crassifolia* (Nance), *Pithecollobium dulce* (Mongollano) y en la raíz de *Punica granatum* (Granado)”, Universidad de el Salvador, 2007.

70. **LAZO, W. Y H. BRAVO.** “Acción Antimicrobiana de algunas plantas de uso medicinal en Chile”. Boletín micológico. Vol. 8 (1-2): 43-45, 1993.

71. **STAPHYLOCOCCUS AUREUS.** Disponible en: <http://www.salud180.com/staphylococcus-aureus-0>.

72. **E. COLI, LA BACTERIA PELIGROSA.** Disponible en : <http://www.efesalud.com/noticias/e-coli-la-bacteria-peligrosa/>

73. **CANDIDIASIS.** Disponible en: <http://www.dmedicina.com/enfermedades/dermatologicas/candidiasis.html>.

74. **SALMONELLA ENTERITIDIS.** Disponible en: <http://www.idexx.es/livestock-poultry/poultry/salmonella-enteritidis.html>.

75. **MELLADO, MARCO; MADRID, ALEJANDRO; JARA, CARLOS; ESPINOZA, LUIS.** “Antioxidant effects of Muehlenbeckia hastulata J. (Polygonaceae) Extracts”, J. Chil. Chem. Soc., 57, núm. 2 (2012).
76. **LA TRANSPIRACIÓN- FACTORES QUE AFECTAN LAS TASAS DE TRANSPIRACIÓN.** Disponible en :
<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1123617035&topicorder=6&maxto=8>
77. **AGUA E HIDRATACIÓN: BASES FISIOLÓGICAS EN ADULTOS-EQUILIBRIO HÍDRICO.** Disponible en:
<http://www.h4hinitiative.com/es/academia-h4h/laboratorio-de-hidratacion/hidratacion-para-los-adultos/equilibrio-hidrico>
78. **MICRONUTRIENTES EN LA FISILOGPIA DE LAS PLANTAS: FUNCIONES, ABSORCIÓN Y MOVILIDAD.** Disponible en:
[http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/3FA84D0333FEDEAA852579A0006BF733/\\$FILE/Micronutrientes%20en%20la%20Fisiolog%C3%ADa%20de%20las%20Plantas.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/3FA84D0333FEDEAA852579A0006BF733/$FILE/Micronutrientes%20en%20la%20Fisiolog%C3%ADa%20de%20las%20Plantas.pdf)

XI. ANEXO

11.1. Análisis Estadístico

11.1.1. Determinación de Flavonoides Totales

En la Tabla 26, presento los valores de la media, varianza, desviación estándar, coeficiente de variación y error estándar para la determinación de flavonoides totales en el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.

TABLA 24. Resultados estadísticos para la determinación de Flavonoides Totales

EXTRACTO ETANÓLICO	
Media	1,67
Varianza	0,0056
Desviación estándar	0,0746
Coeficiente de Variación	0,04467
Error Estándar	0,0304

11.1.2. Determinación de Taninos por el Método de Lowenthal

En la Tabla 27, presento los valores de la media, varianza, desviación estándar, coeficiente de variación y error estándar para la determinación de Taninos por el Método de Lowenthal, en el extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.

TABLA 25. Resultados estadísticos para la determinación de Taninos

EXTRACTO ACUOSO	
Media	1,03
Varianza	0,0184
Desviación estándar	0,1356
Coefficiente de Variación	0,1314
Error Estándar	0,0678

11.1.3. Determinación de Fenoles totales

En la Tabla 28, presento los valores de la media, varianza, desviación estándar, coeficiente de variación y error estándar para la determinación de Fenoles totales en el extracto metanólico de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.

TABLA 26. Resultados estadísticos para la determinación de fenoles totales

EXTRACTO METANÓLICO	
Media	1,17
Varianza	0,0001667
Desviación estándar	0,0129
Coefficiente de Variación	0,0110
Error Estándar	0,0074

11.1.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante

En la Tabla 29, presento los valores de la media, varianza, desviación estándar, coeficiente de variación y error estándar para la determinación de la capacidad antioxidante en el extracto metanólico de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.

TABLA 27. Resultados estadísticos para la determinación la capacidad antioxidante

EXTRACTO METANÓLICO	
Media	6,30
Varianza	0,0446
Desviación estándar	0,2112
Coeficiente de Variación	0,0335
Error Estándar	0,1219

11.1.5. Determinación de la actividad antimicrobiana

En la Tabla 30 y 31, presento los valores de la media, varianza, desviación estándar, coeficiente de variación y error estándar para la determinación de la actividad antimicrobiana en el extracto acuoso de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst.

TABLA 28. Resultados estadísticos para la determinación la actividad antimicrobiana sobre *Salmonella enteritidis****Salmonella enteritidis***

Concentración	5%	15%	25%	50%	75%
Media	28,57	38	44,84	66,67	74,57
Varianza	0	0,5135	0,3254	0	0,0910
Desviación estándar	0	0,7165	0,5704	0	0,3017
Coefficiente de Variación	0	0,0188	0,0127	0	0,0040
Error Estándar	0	0,4137	0,3293	0	0,1742

TABLA 29. Resultados estadísticos para la determinación la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus****Staphylococcus aureus***

Concentración	25%	50%	75%
Media	53,10	58,62	66,22
Varianza	1,0368	0,1094	0,1028
Desviación estándar	1,0182	0,3307	0,3206
Coefficiente de Variación	0,0192	0,0056	0,0048
Error Estándar	0,5878	0,1909	0,1850

11.2. Análisis Fitoquímico

11.2.1. Saponinas

Análisis fitoquímico para saponinas en los extractos con diferentes solventes (FIGURA 13, 14 y 15).



FIGURA 13. Análisis fitoquímico para Saponinas en el extracto clorofórmico



FIGURA 14. Análisis fitoquímico para Saponinas en el extracto hexánico



FIGURA 15. Análisis fitoquímico para Saponinas en los extracto de acetato de etilo, etanol y metanol

11.2.2. Flavonoides

Análisis fitoquímico para flavonoides en los extractos con diferentes solventes (FIGURA 16).



FIGURA 16. Análisis fitoquímico para Flavonoides para los extractos de acetato de etilo, etanol y metanol

11.2.3. Taninos

Análisis fitoquímico para flavonoides en los extractos con diferentes solventes (FIGURA 17 y 18).

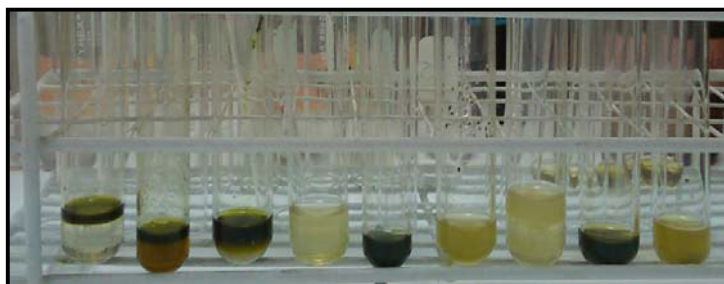


FIGURA 17. Análisis fitoquímico para Taninos en los extracto de acetato de etilo, etanol y metanol

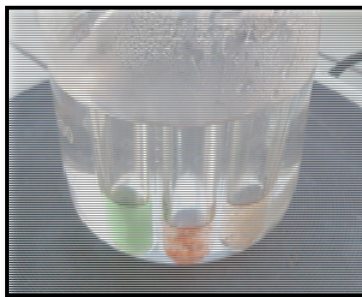


FIGURA 18. Reacción con formaldehído para Taninos en los extracto de acetato de etilo, etanol y metanol

11.3. Determinación de Flavonoides Totales

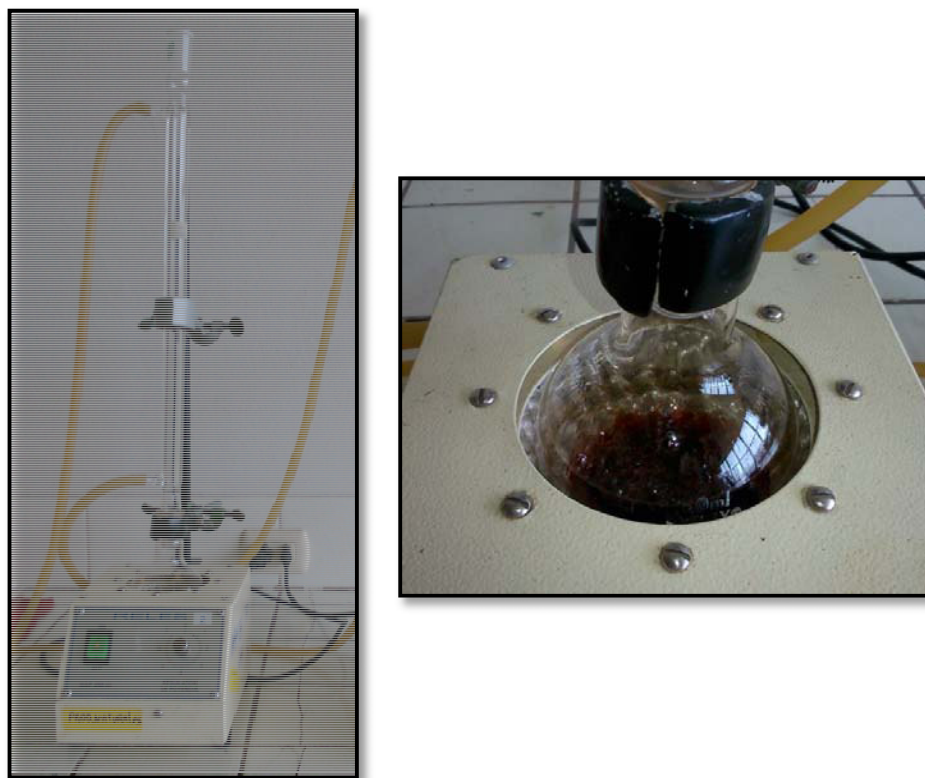


FIGURA 19. Extracción de flavonoides mediante la técnica de reflujo utilizando ácido sulfúrico al 10% y etanol al 50%



FIGURA 20. Muestras para la determinación de flavonoides totales

11.4. **Determinación de la Capacidad Antioxidante**



FIGURA 21. Prueba cualitativa para determinar el factor de dilución



FIGURA 22. Confrontación de la muestra con el DPPH